



TITLE:

筋萎縮性側索硬化症2型原因遺伝子のショウジョウバエホモログの生体内機能(Dissertation_全文)

AUTHOR(S):

高山, 雄太

CITATION:

高山, 雄太. 筋萎縮性側索硬化症2型原因遺伝子のショウジョウバエホモログの生体内機能. 京都大学, 2014, 博士(生命科学)

ISSUE DATE:

2014-05-23

URL:

<https://doi.org/10.14989/doctor.k18483>

RIGHT:

筋萎縮性側索硬化症 2 型原因遺伝子の
ショウジョウバエホモログの生体内機能

高山 雄太

目次

要旨.....	v
略号.....	vii
第一章 序論.....	2
第二章 結果.....	6
2-1. CG7158 は ALS2 ホモログをコードする.....	6
2-2. CG7158/dALS2 には Rab5 の GEF 活性がある.....	6
2-3. dALS2 変異体は生存し稔性がある.....	7
2-4. dALS2 の機能喪失あるいは Rab5 の機能阻害が運動神経の軸索 末端や感覚神経の樹状突起形成に与える影響.....	9
2-5. dALS2 変異体成虫が示した運動能の低下の表現型.....	11
2-6. dALS2 変異体の運動能低下はトランスジェンの発現で回復した	11
2-7. dALS2 変異体の加齢化進行度、寿命、そして酸化ストレスに対す	

る感受性	13
第三 考察	17
3-1. ショウジョウハエにおいて dALS2 と他の 3 つの Rab5-GEFs との間 には機能的な重複があるのか？	17
3-2. ショウジョウハエとヒトにおける運動回路の比較	18
第四章 方法	20
謝辞	25
図	27
文献	61

論文要旨

運動神経疾患は進行性の神経変性病の一つである。その中で、筋萎縮性側索硬化症（amyotrophic lateral sclerosis ; ALS）は、最も特徴が把握され、広く認知されている運動神経疾患の一つであり、運動神経の脱落による筋萎縮などを呈する。ALS2 は、家族性 ALS の原因遺伝子の一つであり、もともと若年発症型の ALS 家系の中で劣性突然変異として同定された。ALS2 タンパク質は、Rab5 タンパク質のグアニンヌクレオチド交換因子（guanine nucleotide exchange factor; GEF）として機能する。GEF 活性の喪失が、神経系の機能異常や変性の原因であるという仮説が立てられているが、生体において運動神経が選択的に障害を受け変性する機構は、まだ十分に理解されていなかった。ALS2 の欠失が引き起こす病理学的な機構を個体レベルで研究することを目的に、これまでに複数の研究グループにより ALS2 ノックアウトマウスが作製され、報告されている。しかしそれらのノックアウトマウスは、運動能力の低下や四肢麻痺のような表現型は呈さないとの報告もあり、ALS2 遺伝子変異が原因で発症する運動神経疾患の病態を再現できていなかった。そこで私は、ショウジョウバエをモデル系として、生体における ALS2 の機能の解明を目指した。

ショウジョウバエのゲノム中には、ALS2 遺伝子のホモログが一つだけ含まれており、私はこの遺伝子を dALS2 と名付けた。培養細胞で dALS2 を

発現させると、ヒトホモログと同様に Rab5 の GEF 活性を示した。私は *dALS2* 遺伝子の突然変異を 2 つ分離した。そして、変異体は生存し稔性があることを確認した。*dALS2* 変異体個体内の特定の神経細胞を調べたところ、軸索終末や樹状突起形態の形成不全が見られた。変異体で見られたこれらの表現型は、Rab5 の機能を喪失した細胞の表現型と同様の特徴を有するが、*dALS2* 変異体の表現型はかなり軽度であった。

一方で、*dALS2* 変異体は加齢依存的に運動能力の低下を示した。この表現型に関しては、ショウジョウバエの変異体は *ALS2* の重要な病理的な特徴を再現した。さらに、変異体で見られた加齢依存的な運動能低下の表現型は、*dALS2* トランスジーンを幅広い組織で発現させることで回復した。この発見により、*dALS2* 変異体において様々な組織特異的にトランスジーンを発現させることによって、表現型を引き起こす原因となっている細胞種を同定できないかと考えた。私は加齢依存的な運動能失調が、*dALS2* 変異体において野生型よりも加齢が促進されたことによる 2 次的な結果である可能性についても検討した。*dALS2* 変異体での神経系加齢マーカーの量や寿命を調べても、その可能性を示唆する証拠は見出されなかった。以上の結果を踏まえ、私は新たな ALS モデル系として *dALS2* 変異体の有用性を議論する。

本論文で使われる主な略号

ALS2	<i>amyotrophic lateral sclerosis 2</i>
MND	Motor neuron disease
UMN	upper motor neuron
LMN	lower motor neuron
GEF	guanine nucleotide exchange factor
RLD	RCC1-like domain
DH/PH	Dbl homology and pleckstrin homology
VPS9	Vacuolar protein sorting 9
GAP	GTPase activating protein
MORN	membrane occupation and recognition nexus
FRET	fluorescence resonance energy transfer
GFP	green fluorescent protein
YFP	yellow fluorescent protein
RFP	red fluorescent protein
NMJ	neuromuscular junction
<i>Ubi</i>	<i>Ubiquitin</i>
TDP-43	TAR DNA-binding protein-43

第一章

序論

序論

運動神経疾患 (Motor neuron disease/MND) は進行性の神経変性疾患の一つで、脳の運動野にある上位運動神経 (upper motor neuron) と脳幹や脊髄にある下位運動神経 (lower motor neuron) の選択的変性を特徴とする。筋萎縮性側索硬化症 (amyotrophic lateral sclerosis/ALS) はもっとも特徴が把握されている MND の一つで、UMN と LMN の脱落による筋萎縮、繊維束性収縮、そして痙縮を呈する (Boillee et al., 2006; Pasinelli and Brown, 2006; Robberecht and Philips, 2013)。これまでに多数の原因遺伝子が同定され、機能が調べられている (Figure 1)。原因遺伝子がコードするタンパク質の機能は、ストレス応答、RNA 代謝、そしてタンパク質恒常性に関わるなど、多岐にわたっている。その一つが *ALS2* であり、もともと若年発症型の ALS 家系の中で劣性突然変異として同定された。この *ALS2* 遺伝子の突然変異が原因で、ヒトは上位運動神経細胞変性に伴う偽球麻痺症状、下肢や顔面筋の痙攣、そして進行性の四肢筋萎縮を発症する (Ben Hamida et al., 1990; Cai et al., 2008; Hadano et al., 2007; Kato, 2008)。

ヒト *ALS2* タンパク質 (しばしば *Alsin* と表記される) には、グアニンヌクレオチド交換因子 (guanine nucleotide exchange factor/GEF) に特徴的なドメイン構造が複数含まれている。それらは、RCC1-like ドメイン (RLD)、the Dbl homology and pleckstrin homology (DH/PH)、そして the vacuolar protein sorting 9 (VPS9) ドメインである (Figure 4 で後述)。*ALS2* の VPS9 ドメインは Rab5 に特異的に結合し、Rab5 の GEF として機能する (Kunita et al., 2004; Otomo et al., 2003)。*ALS2* 突然変異の多くは、ナンセンス変異であり、その結果翻訳されてできるタンパク質は不安定で、*ALS2* の機能は喪失している (Figure 2A; Yamanaka et al., 2003)。細胞生物学的なアッセイにより、*ALS2* の機能喪失は、Rab5 を介したエンドソームの輸送に関わ

る複数の局面に影響を与えることが示唆されている (Devon et al., 2006; Hadano et al., 2006; Lai et al., 2009; Otomo et al., 2008; Figure 3)。例えば ALS2 は、オートファゴソームとエンドソームが融合してできるハイブリッドオルガネラであるアンフィソームの形成を制御すると考えられている (Otomo et al., 2011)。ALS2 タンパク質の GEF 活性の喪失が、神経系の機能異常や変性の原因であるという仮説が立てられているが、生体において運動神経が選択的に障害を受け変性する機構は、まだ十分に理解されていない。

ALS2 の欠失が引き起こす病理学的な機構を個体レベルで研究することを目的に、これまで複数の研究グループにより ALS2 ノックアウトマウスが作製され、報告されている (Cai et al., 2005; Devon et al., 2006; Hadano et al., 2006; Yamanaka et al., 2006)。しかしそれらのノックアウトマウスは、運動能の顕著な低下や四肢麻痺のような表現型は呈さないとの報告もあり、ALS2 遺伝子の突然変異を原因とする運動神経疾患の病態を必ずしも再現できていなかった (例えば Figure 2B の Locomotion activities)。ノックアウトマウスはその一生の中で明瞭な運動失調を呈さないが、Rotor rod test を行った場合、運動機能の軽度な異常が検出されたり (Deng et al., 2007)、動きが遅くなることが報告されている (Yamanaka et al., 2006)。また、運動野と脊髄に含まれる運動神経の数は、野生型とノックアウトマウスの間に有意な違いは見出されていない (Cai et al., 2008)。その一方で、ノックアウトマウスは野生型と比べて酸化ストレス感受性が高く (Cai et al., 2005)、ALS2 ノックアウトマウスでさらに変異型 SOD1 (superoxide dismutase 1) を発現させると、体重の減少、運動失調、そして神経系における不溶性のユビキチン化タンパク質の蓄積といった、SOD1 が原因で引き起こされる病態が再現され、その個体は短命になる (Hadano et al., 2010)。

私は以下に述べる 2 つの理由から、ショウジョウバエを新たなモデル系として、ALS2 の生体内機能の解明を目指すことにした。一点目として ALS2 のみならず、ヒトで同定されている神経変性疾患の多くの原因遺伝子のホモ

ログが、ショウジョウバエに保存されているからである（後述）。二点目は、ショウジョウバエには豊富な遺伝学的実験のツールが揃っており、一部の神経細胞種の定型的な形態を解析することにより、効果的に MND の原因を調べることができると考えたからである (Jaiswal et al., 2012; Lessing and Bonini, 2009)。例えば、ALS 患者の細胞内封入体で検出されるヒト TDP-43 (Feiguin et al., 2009) のショウジョウバエホモログが存在し、その遺伝子を組織特異的にノックダウンした解析から、プレシナプス側での伝達効率の低下が早期に現れる表現型だと報告されている (Diaper et al., 2013)。私は *ALS2* のショウジョウバエホモログに注目し、その突然変異体を分離し、解剖学的に、そして行動レベルでも表現型の解析を試みた。そして、本研究で得られた結果と、これまで示されてきたヒトやノックアウトマウスの報告とを比較し、*dALS2* 変異体の有用性を議論する。

第二章

結果

結果

2-1. CG7158 は ALS2 ホモログをコードする

ショウジョウバエゲノム中には、4種類のヒト Rab5 GEF のホモログと 2種類の Rab5 GTPase 活性化因子(GAP)ホモログが含まれている (Figure 4)。その中で、唯一 CG7158 遺伝子から翻訳される予想タンパク質が、ALS2/Alsin と良く似ていた。これ以降、CG7158 遺伝子を *dALS2* と呼び、そのタンパク質を *dALS2* と呼ぶ。ALS2/Alsin と *dALS2* は、両者ともに、アミノ末端側から同じ順序で 4つのドメインを有する (Figure 4 の hALS2 と *dALS2*)。In vitro の系を用いたアッセイ系で、ヒト ALS2 の Rab5 選択的な GEF 活性には、“membrane occupation and recognition nexus (MORN)”モチーフとカルボキシル末端の“vacuolar protein sorting 9 (VPS9)”ドメインが必要であることが示されていた (Otomo et al., 2003)。*dALS2* と ALS2/Alsin の大きな違いの一つは、*dALS2* には DH ドメインが含まれない点である。ヒト ALS2 には PH ドメインに隣接して DH ドメインがあり、両者が合わさって Rac1 の GEF として機能することが報告されていた (Kunita et al., 2007)。このように、*dALS2* は ALS2 と比べて、より Rab5 に特異的な GEF として機能する可能性が考えられる。

2-2. CG7158/*dALS2* には Rab5 の GEF 活性がある

dALS2 に GEF 活性があるかどうかを調べるために、ショウジョウバエ S2 細胞に *dALS2* タンパク質と、蛍光共鳴エネルギー移動 (fluorescence resonance energy transfer/FRET) プローブである Raichu-Rab5 を共発現させた (Kitano et al., 2008)。このプローブはアミノ末端側から順に、Venus (YFP 改変タンパク質)、EEA1 のアミノ末端側にある Rab5 結合ドメイン、SECFP (CFP 改変タンパク質)、そして Rab5 を連結した構造になっている。そして、[CFP 励起での YFP 蛍光強度] / [CFP 励起での CFP 蛍光強度] の

数値（以下 FRET 効率と呼ぶ）の上昇は、不活性化状態である GDP 結合型 Rab5 と比較して、活性化状態である GTP 結合型 Rab5 の割合が上昇したことを反映する (Figure 5A; Kitano et al., 2008)。空ベクターを共導入した場合（Figure 5B の “control” 青色のバー）と比べて、dALS2 を Raichu-Rab5[WT] と共発現させたときに (Figure 5B の “dALS2[WT]” 青色のバー)、FRET 効率が有意に上昇した。

この FRET 効率が、細胞内の GEF 活性の上昇を反映しているのかどうか、以下のように検証した。Raichu-Rab5[WT] ではなく、恒常的な GDP 結合型 Rab5 である Rab5[S34N] (Entchev et al., 2000) を組み込んだ Raichu-Rab5[S34N] を、dALS2 と共発現させた。Raichu-Rab5[S34N] は細胞内の GEF 活性が上昇しても、FRET 効率が上昇しないことが予想できる。実際に、dALS2 と共発現させても変化しなかった (Figure 5B の “dALS2[WT]” 赤色のバー)。この結果から、dALS2 を Raichu-Rab5[WT] と共発現させた際に検出された FRET 効率の上昇は、Rab5 が GDP 結合型から GTP 結合型へと移行したためであると示された。

私はまた、VPS9 ドメインに保存された二つのアミノ酸を置換した効果を調べた (Figure 6A と 6B)。これらのアミノ酸は野生型 ALS2 の GEF 活性に必要であることが示されていた (Otomo et al., 2003)。この 2 つのアミノ酸それぞれの置換型 dALS2 (dALS2[P1425A] と dALS2[L1439A]) を発現させると、Raichu-Rab5 の FRET 効率は上昇したが、野生型 dALS2 ほどの上昇は検出されなかった (Figure 5B)。以上の結果より、dALS2 タンパク質においてもこれらのアミノ酸が、GEF 活性に重要であることが示された。

2-3. *dALS2* 変異体は生存し稔性がある

dALS2 の生体内機能を調べるために、*dALS2* の突然変異を分離した。coding sequence の開始コドンから 120 bp 上流に挿入された既存の P 因子をジャンプアウトさせ、coding sequence を約 30 % 欠失する二つの独

立したアリル (Ex44 と Ex54) を分離した (Figure 7A)。アリル Ex44 の欠失部位は、開始コドンから RLD ドメイン全体までまたがっている (Figure 7C)。また、周囲のゲノムに傷を付けず、完全に野生型に復帰した precise jumpers を 2 系統樹立し (Ex101 と Ex95)、いずれかのホモ接合体を以降の表現型解析のコントロール、もしくは野生型として用いた。Ex44 と Ex54 のホモ接合体は生存し、稔性がある。そして、いずれの成虫も形態的に正常である。このように、ALS2 ノックアウトマウスがそうであったように (Cai et al., 2005; Devon et al., 2006; Hadano et al., 2006; Yamanaka et al., 2006)、dALS2 はショウジョウバエの生存には必要ではなかった。以降、さらに表現型を解析するために、ことわらない限りほとんどの実験では Ex54 よりも大きな欠失である Ex44 を用いた。そして、Ex44 のホモ接合体を *dALS2*^{-/-} と表記する。

RT-PCR 解析により、成虫 *dALS2*^{-/-} はアミノ末端側の coding sequence を欠失していることを確認した (Figure 7B)。*dALS2*^{-/-} のゲノムにおいて、欠失された配列の下流にある最初の開始コドンからもし翻訳が開始された場合、アミノ末端側のドメインを欠くポリペプチドが作られることが予想される。そのような断片が生成されているかどうかを調べるために、私はカルボキシル末端側の VPS9 ドメインを認識する抗体 (anti-C2) を作製した (Figure 7C)。またアミノ末端側を抗原とする抗体 (anti-N1) も作製したが、anti-C2 は anti-N1 より検出感度が劣っていた。そして、anti-N1 を用いても、組織破碎液中に内在の dALS2 を高感度では検出できなかった (Figure 7D)。従って、アミノ末端側のドメインを欠く断片が生成されている可能性は排除することができなかった。ただ、RLD ドメインを欠損した ALS2 タンパク質はエンドソームに局在できなくなることが知られており (Yamanaka et al., 2003)、もし Ex44 や Ex54 のアリルから dALS2 断片が翻訳されていたとしても、ほとんど機能的ではないと考えられる。

Rab5 は、幼虫の成虫原基や神経系、そして成虫の神経系で組織間の発現強度に違いは見られるものの、幅広い組織で発現することが示されていた

(Chan et al., 2011)。dALS2 も、発生中の胚の神経系や表皮 (Figure 8)、幼虫の中枢神経系や腸、そして成虫の脳と腸といった幅広い組織で発現している (St Pierre et al.)。

2-4. dALS2 の機能喪失あるいは Rab5 の機能障害が運動神経の軸索末端や感覚神経の樹状突起形成に与える影響

つぎに私は、dALS2^{-/-} 変異体の神経病理学的な異常を探索した。それと並行して、変異体で検出される表現型を Rab5 活性の制御機構の異常としてどの程度説明することができるのか、調べることにした。そのために、野生型神経細胞で Rab5 のドミナントネガティブ型である Rab5[S34N] (Entchev et al., 2000) を発現させ、変異体で見られた表現型と共通性があるかどうかを検討した (Figure 10-Figure 12)。

まず幼虫期の運動神経の軸索末端に注目した。ショウジョウバエの運動神経の細胞体は、脊椎動物の脊髄に相当する腹部神経節に位置する。一方、運動神経の軸索は腹部神経節から末梢に向って伸長し、規則正しく各筋肉に投射して神経筋接合部 (neuromuscular junction/NMJ) が形成される (Figure 9A; Kohsaka et al., 2012; Menon et al., 2013)。軸索終末には細胞膜が局所的にふくらんだ構造ができシナプス小胞が蓄積する (各々を bouton と呼ぶ)。幼虫のプレシナプスを可視化するために、プレシナプスの細胞膜とアクティブ・ゾーンを2重染色し、アクティブ・ゾーンマーカーである Brp 陽性の bouton (Coyle et al., 2004) の数を定量化した (Figure 9B)。投射先の筋肉の面積で補正した bouton の数で比較すると、野生型と変異体の間に有意な差は検出されなかった (Figure 10B)。ポストシナプスマーカー (Mhc-CD8:YFP:Sh; Zito et al., 1999) 陽性な bouton の数にも違いは見られなかった (Figure 10C and 10D)。また、野生型と変異体の間に筋肉の面積にも違いは検出されなかった (データは示さない)。

次に成虫のホールマウント試料を作製し、運動神経軸索の表現型を調べた (Figure 11; Hebbar et al., 2006)。まず羽化後 3-4 日と 3 週目の変異体を観察

したところ、いずれも軸索を正常に伸張しているように見えた（データは示していない）。羽化後 2 週の成虫の腹部 NMJ に注目し、プレシナプスの面積とそれぞれの軸索末端の bouton 数を定量化した（Figure 11B-11E）。補正した bouton 数に違いは見られなかったが（Figure 11E）、軸索末端あたりの bouton 数の絶対値で比較すると、変異体の方が有意に増加していた（Figure 11D）。

運動神経で *Rab5*[S34N] を発現させるために、*OK371-Gal4* 系統を用いた。この系統では、*Gal4* 遺伝子は vesicular glutamate transporter タンパク質をコードする遺伝子のエンハンサーをトラップしている（Mahr and Aberle, 2006）。*Rab5*[S34N] を発現させると、幼虫と成虫のいずれにおいても、軸索末端の bouton 数が増加した（Figure 10E と 10F；Figure 10G と 10H を比較；Figure 11F と 11G を比較）。*dALS2* 変異体の表現型と比較すると、*Rab5*[S34N] 発現の効果は明らかにより劇的であった。bouton 数の増加以外にも、幼虫の NMJ での軸索末端の形態を観察すると、コントロールに比べて一つ一つの bouton が小さくなる異常が観察された（Figure 10E）。*Rab5*[S34N] 発現が NMJ の形態形成にどのような影響を与えるかは、本研究により初めて示された。一方で、幼虫 NMJ の形態形成期では *Rab5*[S34N] の発現を低レベルに抑えて、形態的な発生は阻害しないようにして、NMJ が形態的に成熟した後に *Rab5*[S34N] を高レベルで発現させた報告はある（Wucherpfennig et al., 2003）。この研究では、*Rab5* がシナプス伝達の効率を制御することが示された。

他のアッセイ系として、dendritic arborization (da) ニューロンを採用した（Figure 12; Jan and Jan, 2010; Shimono et al., 2009）。*Rab5* の機能を喪失した da neuron は、樹状突起の分岐数を劇的に減少することが示されていた（Figure 12A-12C; Satoh et al., 2008）。*dALS2* 変異体での da neuron の表現型を定量化したところ、樹状突起形態の表現型は、*Rab5* の機能喪失と比べてはるかに軽度であった（Figure 12D と 12E）。野生型 da neuron と比較して、突起全長と突起の分岐数はそれぞれ 11% と 19% 減少していたが、coverage index に違いは見出されなかった（Figure 12F）。なお、*dALS2*[WT] を過剰発

現しても、NMJs や樹状突起の形態に影響は見られなかった (Figure 10F ; da neuron のデータは示していない)。

以上をまとめると、Rab5 の機能喪失は神経細胞の形態形成に強い影響を与えたのとは比べ、*dALS2* 変異体での表現型はずっと軽度である。この理由としては、ショウジョウバエに保存されている、他の Rab5 GEF の一つである Rabex-5 (Figure 4) が貢献している可能性が考えられる。他の系で、Rabex-5 はシナプス小胞や樹状突起形態を制御することを示した報告がある (Mori et al., 2013; Sann et al., 2012)。

2-5. *dALS2* 変異体成虫が示した運動能の低下の表現型

細胞形態の表現型検出に加えて、私は運動神経で *Rab5*[S34N] を発現させた成虫の運動能が、著しく低下することを見出した (Figure 13A; supplemental movies 1 and 2)。このことから、*dALS2*^{-/-} 変異体の運動能についても調べることにした。その結果、*dALS2* の機能喪失によって加齢依存的に運動能が低下することを示すことができ (Figure 14 and 15)、この表現型が *dALS2*^{-/-} 変異体が示す最も重要な表現型だと考えられる。

採用した運動アッセイ法は、negative geotaxis assay と呼ばれている。ショウジョウバエにおいて、運動能を検証することができる確立された方法である (Figure 13B-13D; Ali et al. 2011)。私は *dALS2*^{-/-} 変異体 (*Ex44/Ex44*) と野生型 (*Ex101/Ex101* あるいは *Ex95/Ex95*) を同時に飼育し、変異体個体の運動能を野生型と比較検証した (Figure14)。その結果、羽化後 2 週経つと野生型に比べ変異体の方が有意に運動能が低下することを見出した。羽化後 5-6 日目、あるいはもっと若齢の成虫では異常は検出されていない。羽化後 4 週経つと、変異体のメスは、所定の時間内ではほとんどある一定の高さまで登ることができない (Figure 13C and 13D)。

2-6. *dALS2* 変異体の運動能低下はトランスジーンの発現で回復した

変異体の成虫が呈する運動能障害は、*dALS2* の機能喪失が原因なのだと

うか。このことを検討するために、私は組織特異的に野生型 *dALS2* cDNA を発現させることにより、表現型が回復するかどうか検証することにした。*dALS2* が神経系以外でも発現していること (St Pierre et al., 2014) から、まず幅広い組織で発現させてその効果を調べた。そして、マウスで *ALS2* が機能することが重要な組織として（証明されてはいないものの）運動神経が示唆されていたことから、組織特異的な発現を試みることにした。

幅広い組織での発現を実現するために、野生型 *dALS2* トランスジーンを *Ubiquitin(Ubi)-Gal4* を用いて発現させた (Figure 15)。トランスジーン発現のネガティブコントロールとして、*myr-mRFP (mmRFP)* の発現を採用した。2 週齢の *dALS2*^{-/-} 変異体は、野生型と比較して運動能が有意に低下した。そして、この表現型は *dALS2* トランスジーン発現により正常な値まで回復した (Figure 15B の青色と緑色で示したデータポイントを比較)。これらの結果から、*dALS2* 変異体の加齢依存的な運動能の低下は、*dALS2* の機能喪失が原因であることが示された。表現型は軽度だが、*ALS2* ノックアウトマウスでも、加齢依存的な運動調整能力の低下が報告されている (Cai et al., 2005)。*Ubi-Gal4* を用いた場合に発現する組織を念のため調べてみたところ、幼虫の運動神経では発現していたが、予想外だったことに成虫の運動神経での発現が検出できなかった（データは示していない）。幼虫期の運動神経で発現した *dALS2* タンパク質の一部が、成虫になっても残存して機能したために、変異体の運動能が回復したのかもしれない。あるいは *Ubi-Gal4* を用いて変異体の運動能が回復したのは、運動神経（正確には下位運動神経）以外の細胞で *dALS2* の機能が必要であり、*Ubi-Gal4* はその細胞種を含んで幅広く発現したことが原因かもしれない。この可能性については、2つ後ろのパラグラフと第三章で議論する。

次に、*dALS2* トランスジーンを運動神経で発現させ、変異体の表現型が回復するかどうか検証を行った (Figure 16)。この実験では、*Gal4* 系統として *OK371-Gal4* を採用した。しかしながら、このレスキュー実験では、表現型が回復したかどうかを判断することは困難であった。なぜなら、*dALS2*

を野生型運動神経で発現させると、運動能が低下してしまったからである (Figure 16 の赤色とオレンジ色のデータポイントを比較)。 *mmRFP* を発現させた変異体に比べ、 *dALS2* を発現させた変異体は運動能の有意な回復は示さなかった (Figure 16B の青色と緑色のデータポイントを比較)。

dALS2 トランスジーンを運動神経で発現させても運動能を回復させることができなかった結果については、以下で述べるように複数の解釈ができるだろう。まず、運動神経 *Gal4* (*OK371-Gal4*) では、*Gal4* によって誘導される *dALS2* の発現量が過剰だったためなのかもしれない。そして、運動神経における *Rab5* の活性化状態が生理的なレベルから逸脱し、時空間的な *Rab5* の活性制御機構が破綻してしまうため、表現型を正常に戻すことに失敗した可能性が考えられる。別の可能性としては、加齢に伴う運動能低下を防ぐには、*dALS2* の機能は運動神経以外の細胞種で必要とされているのかもしれない。そして *OK371-Gal4* とは異なり、*Ubi-Gal4* はその細胞種で発現しているのかもしれない。豊富な *Gal4* 系統のストック (Jenett et al., 2012) を利用し、*dALS2* の発現レベルを生理学的に適切な範囲に収める工夫を施せられれば、特定の細胞種を同定する可能性に挑戦することができるだろう (第三章で考察する)。

2-7. *dALS2* 変異体の加齢化進行度、寿命、そして酸化ストレスに対する感受性

野生型のショウジョウバエも加齢に伴って運動能が低下することが知られている (Ganetzky and Flanagan, 1978; Le Bourg and Lints, 1992)。このことより私は、野生型と比べて *dALS2* 変異体では加齢化が加速したために、その二次的な結果として運動能が低下した可能性を検証しようとした。通常、加齢とともに、ショウジョウバエの神経系では複数の必須のオートファジー関連遺伝子の発現レベルが低下する。このことが原因となり、ユビキチン化タンパク質や p62/Ref(2)P が蓄積する (Bartlett et al. 2011; Simonsen et al. 2008; Tonoki et al. 2009)。具体的には、オートファジーに異常が生じる *atg8*

変異体で、ユビキチン陽性のシグナルが若齢個体からも検出されることや、神経系で *atg8* を過剰に発現することにより、不溶性のユビキチン化タンパク質の蓄積が抑制されることが明らかにされている (Simonsen et al. 2008)。また、オートファジーからエンドリソソームを介したタンパク質の分解経路に dALS2 が関与する可能性が提唱されていることも考慮した (Figure 17)。そこで特定の加齢時期に、野生型と dALS2 変異体のユビキチン化タンパク質と p62 の蓄積レベルを検証することにした (Figure 18)。

羽化後 3-4 日では、野生型でも dALS2 変異体でも、脳のどの領域からもユビキチン陽性のシグナルは検出されなかったが、羽化後 2 週の個体からは、両方の遺伝子型からユビキチンシグナルが検出された (Figure 18A)。組織破碎液を用いたウェスタンブロット解析により、私はユビキチン化タンパク質と p62 の蓄積レベルを検証した。しかし調べた加齢時期において、野生型と変異体の間に明らかな違いは検出されなかった (Figure 18B)。破碎液中で検出できるタンパク質ユビキチン化の程度に加えて、不溶性のユビキチン化タンパク質 (insoluble ubiquitinated protein/IUP) の蓄積レベルにも違いはなかった (データでは示していない)。dALS2 変異体とは対照的に、以前の報告にあるように、若齢の *atg8* 変異体からはユビキチン陽性のシグナルは検出できた (データは示していない)。このように、dALS2 変異体で加齢が促進している証拠を私は見出すことができなかった。これらの結果は、オートファジー機構の中心的な役割を担う代表的なタンパク質と比べて、dALS2 はタンパク質恒常性に果たす役割が小さいことを示唆している。

次に野生型と dALS2 変異体の寿命を測定した。私が行った実験条件では、変異体 (Ex44/Ex44) の方がいずれの野生型 (Ex101/Ex101 と Ex95/Ex95) よりも寿命が長くなっていた (Figure 19A-19D)。しかしながら、*Ubi-Gal4* を使って dALS2 トランスジーンを発現させて Ex44/Ex44 で見られた寿命延長の表現型を回復させようとしたが、この条件下ではかえって野生型より短命になってしまった (Figure 20B)。加えて、もう一つの欠失アリル (Ex54/Ex54) のホモ接合体のメスは、寿命延長の表現型を示さなかった (Figure

19F)。このように、私は *Ex44/Ex44* で見られた寿命延長の表現型が *dALS2* の機能喪失が原因なのかどうか、結論付けることができなかった。それでも、*dALS2* の機能喪失は個体の寿命を縮めることはないらしい。以上の結果から、野生型と比べて *dALS2* 変異体では加齢化が加速している証拠は得られなかった。従って加齢した *dALS2* 変異体で見られた運動能力の低下は、変異体の加齢が野生型より加速した結果を見ている可能性は低いと考えられる。

ALS2 ノックアウトマウスが野生型と比較して、酸化ストレス感受性が高くなるという報告があった (Cai et al. 2005)。そこで *dALS2* 変異体でも酸化ストレス感受性が高くなっているかどうか調べるために、野生型と *dALS2* 変異体の成虫 (*Ex44/Ex44* そして *Ex54/Ex54*) を、過酸化水素を含む培地上で飼育し (Vrailas-Mortimer et al. 2011)、生存率を記録することにした。この条件下では、*Ex44/Ex44* のメスは野生型メスよりも、より高い酸化ストレス感受性を示した (Figure 21A) が、*Ex54/Ex54* を用いたとき再現性のある結果を得ることができなかった (Figure 21B)。このアッセイにおいても、*Ex44/Ex44* で見られた酸化ストレス高感受性の表現型は、*Ubi-Gal4* で *dALS2* トランスジーンを発現させても回復することはなかった (Figure 21C-21D)。

第三章

考察

考察

本研究において私は、ショウジョウバエ *dALS2* 変異体を分離し、ALS2 の病態を研究する新しいモデル系となるかどうかについて検討した。*dALS2* 変異体が生じた加齢依存的な運動能力の低下は、ALS2 の重要な病態を再現した。私はこの *dALS2* 変異体を用いた解析により、*dALS2* 機能を必要とする細胞種を同定することが可能ではないかと考えている。また、症状を軽減したり、あるいは発症を防ぐ遺伝学的なバックグラウンドや医薬品の開発に役立つかもしれない。

3-1. ショウジョウバエにおいて *dALS2* と他の3つの Rab5-GEFs との間には機能的な重複があるのか？

ヒト ALS2 の VPS9 ドメインは GEF 活性を持つことが示されている (Otomo et al., 2003)。本研究では野生型 *dALS2* タンパク質が Rab5 の GEF activity を有することを示した (Figure 5B)。*dALS2* に加えて、3つのショウジョウバエタンパク質が VPS9 ドメインを持つ (Figure 4)。私は *dALS2* 変異体が生ずる細胞レベル（軸索終末や樹状突起の形態）および個体レベルの表現型が、Rab5 の機能を喪失した場合の表現型よりもかなり軽度であることを示した。これは他の Rab5 GEF の寄与を示唆しているのかもしれない。線虫の GABA 作動性運動神経においては、Rabex-5 ホモログが主要な Rab-5 GEF であり、Gapex-5 ホモログもまた働いていることが報告されている (Sann et al., 2012)。ではショウジョウバエではどうだろうか。

ショウジョウバエにおいては、Rabex-5 ホモログ (*dRabex-5*) と Rin1 ホモログ (*sprint*) について突然変異体を用いた解析が報告されている (Figure 4)。*dRabex-5* 変異体は幼虫期後期で致死となり、しかもメラノーマが生じる。この表現型は *dRabex-5* が Ras シグナル伝達経路での機能を果たせなくなった結果であることが報告されている (Yan et al., 2010)。一方、*sprint* 変異体は完全に生存可能であり稔性も有する (Jekely et al., 2005)。*dALS2*^{-/-} *dRabex-5*^{-/-} 二重変異体を作出したところ、この二重変異体は *dRabex-5*^{-/-} 変異体よりも幼虫初期で

致死となった（データは示していない）。この結果は、*dALS2* と *dRabex-5* との間に遺伝学的な相互作用が存在することを示しており、*dALS2* と *dRabex-5* との間で発生における重要な機能を共有しているのかもしれない。これらの *dALS2* 以外の Rab5-GEF が、NMJ の形成や *da neuron* の樹状突起形成に寄与していないかを調べる目的で、*dALS2* と *dRabex-5* との間または *dALS2* と *sprint* との間での遺伝学的相互作用を検討したが、ポジティブデータは得られなかった（データは示していない）。神経細胞の形態的特徴に着目した解析だけでなく、運動能アッセイ (negative geotaxis assay) も利用してこれらの Rab5 GEF 間の機能的重複の可能性を検討すべきだろう。

3-2. ショウジョウハエとヒトにおける運動回路の比較

ヒト ALS における運動神経細胞の機能障害を理解する上で、疾患の分子レベル、細胞レベル、そして回路レベルそれぞれの基盤を理解することが欠かせない (Rothstein, 2009)。ヒトとショウジョウバエの間では、運動回路における運動神経、固有受容性（感覚）ニューロン (proprioceptive neuron)、そして介在神経といったいずれの基本構成要素は保存されている（例えば、Jan and Jan, 2010、Kohsaka et al., 2012 や、Menon et al., 2013）。それでも、哺乳類の回路と比べてショウジョウバエの運動回路においては、構成素子としての神経細胞や細胞間の連結の全体像が現時点では不明の点が多い (Imlach et al., 2012)。例えば、ショウジョウバエでは、腹側神経節（哺乳類の脊髄に相当する）内に細胞体があり、軸索を末梢に伸長させて筋肉とシナプス (NMJ) を形成する運動神経（哺乳類での下位運動神経/lower motor neuron）については、単一細胞のレベルで同定されている (Kohsaka et al., 2012; Menon et al., 2013)。しかしながら、その運動神経との間にシナプス結合を形成し、支配している上位の神経細胞（哺乳類での上位運動神経/upper motor neuron）はいまだに同定されていない (Figure 22)。成虫においては運動を制御している高次の中枢として、脳内の ellipsoid body neuron (EB neuron) が報告されている (Strauss, 2002)。ヒト ALS においては、下位のみならず上位運動神経の機能に、むしろ ALS の型

によっては上位運動神経の機能に、障害が発生する (Ben Hamida et al., 1990; Cai et al., 2008; Hadano et al., 2007; Kato, 2008)。その意味で、ショウジョウバエの上位運動神経／upper motor neuron の同定は、ショウジョウバエが ALS モデルとしての存在意義を維持し、そして高める上で重要な課題である。

ショウジョウバエは分子遺伝学的な手法にすぐれている一方で、上記のように哺乳類に比べて中枢神経系での回路の解剖学的な記載については不十分な点がある。この弱点を克服する目的で、ショウジョウバエの中枢神経系内の限られた数の神経細胞を選択的に標識する GAL4 系統が多数分離され、ストックセンターを通じて公開されている (Jenett et al., 2012)。そしてこのリソースを利用して、中枢神経系内の回路同定が進められているので、ショウジョウバエ上位運動神経／upper motor neuron が近い将来同定されることが期待される。

ショウジョウバエ上位運動神経で発現する GAL4 系統が分離されれば、その細胞で *dALS2* トランスジーンを発現させて、*dALS2* 変異体の表現型をレスキューできるかどうかを調べることができるだろう。また、上位運動神経を選択的に標識することにより、*dALS2* 変異体の上位運動神経にどのような異常が生じているのか詳細に検討することができる。具体的には、ヒト ALS において TDP-43 を主成分とする凝集体ができるように (Robberecht and Philips, 2013)、*dALS2* 変異体の上位運動神経内に TDP-43 ホモログの凝集体が形成されているのかどうか、などである。NMJ（下位運動神経の軸索と筋肉との間のシナプス結合）における神経伝達物質の開口放出の制御には、Rab5 が寄与している (Wucherpfennig et al. 2003) ので、*dALS2* 変異体の NMJ および上位—下位運動神経間のシナプス結合や伝達が正常なのかどうかも、検討すべきであろう。

第4章

材料と方法

材料と方法

4-1. ショウジョウバエ系統

細胞の可視化やトランスジーンの発現には GAL4-UAS システムを用いた (Brand and Perrimon, 1993)。Gal4 系統として、*Gr-Gal4* (Weiss et al., 2011)、*OK371-Gal4* (Mahr and Aberle, 2006)、*Ubi-Gal4* (the Bloomington Stock Center) を用いた。UAS 系統としては、*UAS-mCD8:GFP*、*UAS-myr-mRFP* (*mmRFP*, the Bloomington Stock Center)、*UAS-mCD8:3xEGFP* (Kakihara et al., 2008)、*UAS-Rab5[S43N]* (Entchev et al. 2000) を用いた。その他には、*Mhc-CD8:YFP:Sh* (Zito et al., 1999)、*atg8²* (the Bloomington Stock Center) を用いた。*CG7158* 変異体については、*CG7158^{G4607}* (the Bloomington Stock Center) を元に P 因子を転移させ、150 系統の excision lines を樹立した。*CG7158* 遺伝子内の欠失は、*CG7158* 遺伝子を含む領域を PCR 法によって増幅し、サンガー法によって塩基配列を決定することによって同定した。プライマーを設計したゲノム領域については図 7A に図示した。プライマーの配列は以下の通りである。

5'-GCGTATGCAAACCAGCAGTA-3'

5'-CCCGAAATCTTTGAGCTGAG-3'

トランスジェニックショウジョウバエの作製には従来の方法を用いた。

4-2. 分子生物学的手法

Raichu-Rab5[WT]と Raichu-Rab5[S34N]の FRET プローブ (Kitano et al. 2008) は、pUAST ベクターに挿入した。pUAST-3xHA:dALS2[WT]の作製するために、*dALS2/CG7158* の全長 coding sequence (CDS) は pOT2-LD33266 (Berkeley Drosophila Genome Project) を鋳型として増幅し、pUAST-3xHA に挿入した。*dALS2[P1425A]*と *dALS2[L1439A]*は、以下のプライマーを用いた部位特異的変異導入法 (Site-Directed Mutagenesis) によって作製し、pUAST-3xHA に挿入した。

dALS2[P1425A]: 5'-GGTGAGCGCTATCATGTTGT-3' と 5'-ACAACATGATAGCGCTCACC-3'

dALS2 [L1439A]: 5'-ACCAGCGTGGGGAACAGCA-3' と 5'-TGCTGTTCCCCACGCTGGT-3'

4-3. RT-PCR と in situ hybridization

野生型、もしくは *dALS2*^{-/-} の成虫から RNeasy kit (QIAGEN) を用いて RNA を抽出し、Ready-To-GO RT-PCR Beads (GE Healthcare UK) を用いて cDNA を合成した。*dALS2* と *Actin5c* の発現については、以下のプライマーを用いて検出した。

dALS2: 5'-TCTGCAGCAGTCCAGCACATAC-3' と 5'-CATTTTGCCGAAACCTTCAATG-3'

Actin5c: 5'-GTGCTGTGTGGATACTCC-3' と 5'-TGTGGTGCCAGATCTTCTCC-3'

in situ hybridization 用の RNA プローブは、cDNA clone LD33266 (Berkeley Drosophila Genome Project) を鋳型として作製し、固定した embryo にハイブリダイズさせた。in situ hybridization の方法については以前の報告に基づいた (Matsubara et al. 2011)。

4-4. 培養細胞と FRET イメージング

S2 (Schneider's cell line 2) 細胞の培養は、25℃の空気下で、細胞培養用のシャーレやフラスコを用いて行い、3~4 日ごとに継代した。培養液として Schneider's Drosophila Medium (Gibco BRL) に非動化した牛胎児血清 (FBS) 10% と penicillin/streptomycin を加えたものを用いた。pDA-Gal4 (actin-promoter Gal4; 松崎文雄研究室より分与)、pUAST-Raichu-Rab5、そして pUAST-3xHA:dALS2[WT]、pUAST-3xHA:dALS2[P1425A]、または pUAST-3xHA:dALS2[L1439A]を、HilyMax (同仁化学研究所) を用いて S2 細胞にトランスフェクションした。トランスフェクションして 2 日後に顕微鏡での観察を行った。FRET イメージングの方法は以前の報告に基づいて行った (Tsuyama et al., 2013)。

4-5. 抗体作製とウェスタンブロッティング

GST タンパク質に dALS2 の N 末の 410 アミノ酸残基または C 末の 196 アミノ酸を付加したタンパク質をモルモットに免疫することで、anti-N1 または anti-C1 抗体をそれぞれ作製した。S2 細胞は超音波処理によって SDS サンプルバッファーに溶解した。成虫の頭部は SDS サンプルバッファー中でホモジェナイズし、

すぐにボイルした。ライセートは WIDE RANGE Gel Preparation Buffer for SDS-PAGE (Nacalai) を用いて作製した 8%のポリアクリルアミドゲルを用いて分離し、PVDF membranes (Millipore) に転写した。過剰発現した ALS2 の検出には、1 レーンあたり 2.5 匹分の成虫頭部に対応する量のライセートをロードした (図 7C)。ユビキチン化されたタンパク質や p62 の検出には、7.5 匹分の成虫頭部に対応する量のライセートをロードした (図 16B)。それぞれの一次抗体は以下の濃度で用いた。guinea pig anti-dALS2 N1 (1:1000)、rabbit anti-p62 (1:4000; Piracs et al., 2012)、mouse anti-polyubiquitin FK2 (1:1000; COSMO BIO)、mouse anti-actin MAB1501 (1:1000; Millipore)。シグナルは Chemi-Lumi One Super (ナカライテスク) を用いて検出した。

4-6. 免疫染色

3 齢幼虫は PBS 中で解剖し、3.7%ホルムアルデヒドを含む PBS 中で 10 分間固定した。その後一次抗体を加えて 4℃で一晩インキュベートし、2 次抗体を加えて 4℃で 1~2 日間インキュベートした。成虫の脳は 3.7%ホルムアルデヒドを含む PBS 中で 1 時間固定した。一次抗体は以下の濃度で用いた。rabbit anti-HRP (1:300; Jackson ImmunoResearch)、mouse NC82 (1: 100; Developmental Studies Hybridoma Bank [DSHB] at the University of Iowa)、mouse anti-polyubiquitin FK2 (1:500; COSMO BIO)、rabbit polyclonal antibody against Drosophila p62 protein (1:2000; Piracs et al. 2012)。

4-7. イメージングと定量化

開きにした 3 齢幼虫の腹部第 2 体節 (A2) の muscles 6/7 における運動神経終末を観察し、以前の報告 (Colyle et al. 2004) に基づいて bouton の数を数えた。成虫腹部の NMJ の観察には、Shimono et al. (2009) に基づいて成虫をマウントし、腹板の神経終末を観察した。定量化については、Hebbar et al (2006) に基づいて腹部第 4 体節 (A4) または第 5 体節 (A5) の神経終末の area size と bouton の数を定量化した。幼虫の da neuron の観察や定量化は基本

的に以前の報告の方法に従った (Hattori et al., 2007; Matsubara et al., 2011; Parrish et al., 2009)。

4-8. 行動アッセイ (Negative geotaxis assay)、寿命アッセイ、および酸化ストレス感受性アッセイ

それぞれの遺伝子型の個体を羽化後 1 日後に採取し、1 日交配させた。その後、オスとメスを分離し、それぞれの性別の個体を 10 匹ずつ 10 グループに分けた。これらの個体は同じ時期に同じインキュベータで飼育し、アッセイに用いた。Negative geotaxis assay では、それぞれのグループを空のテストバイアルに移して。優しくバイアルを叩いてショウジョウバエを底に落とし、10 秒後に 8 cm 以上の高さまで上った個体数を数えた (図 11B)。それぞれのグループに対してこの試行を 10 回行い、平均 (average climbing pass rate) をそれぞれのデータポイントとしてプロットした (図 12-14)。Negative geotaxis assay については (Ali et al., 2011) を、longevity については (Linford et al., 2013) を、sensitivity to oxidant exposure については (Vrailas-Mortimer et al. 2011) を元に行った。

4-9. データベース

ホモロジー検索には NCBI BioSystems Database (Geer et al., 2010) の Homologene を、ドメインの検索には Pfam27.0 (Finn et al., 2014) をそれぞれ用いた。*Drosophila melanogaster* の遺伝子情報については FlyBase (St Pierre et al., 2014) を用いた。

謝辞

本研究は、京都大学生命科学研究科の上村匡教授のご指導のもと約7年にわたって行われ、その間多くの方のお世話になりました。本論文を結ぶにあたり、まず指導教員である上村匡先生に感謝いたします。また、上村研究室のメンバーの中でも、伊藤玲奈博士と津山泰一氏とは、共同研究をさせて頂き、研究者としての心構えや姿勢を教えてくださいました。同級生の松原大佑博士、下野耕平氏には、厳しい意見も言い合える仲間として大学院生活を支えていただきました。二股真由美さんにはショウジョウバエの餌の作製など実験補助のお仕事を、三宅由希子さん、清水久美子さん、水越絢子さん、沖かなえさんには事務のお仕事を通じて、大学院での研究を支援していただきました。また、ここに挙げていない研究室の方々にも、公私両面にわたって多大なご支援をいただきました。改めて感謝いたします。

さらに、本研究には多くの方々のご協力がありました。京都大学生命科学研究科の米原伸先生には、DNAシーケンサなどの研究機器を使用させていただきました。John Carlson 教授、Gabor Juhász 教授、能瀬聡直先生、浜千尋先生、Pernille Rørth 教授、Dirk Bohmann 教授、松田道行先生、秦野伸二先生、池田穰衛先生、福田光則先生、殿城綾子先生、吉浦茂樹先生、高坂洋史先生には、ショウジョウバエ系統やDNA、抗体などの研究材料を分与して頂いたり、実験技法のアドバイスを賜りました。この他にも、京都工芸繊維大学ショウジョウバエ遺伝資源センター、Bloomington Stock Center、Vienna Drosophila RNAi

Center、the Developmental Studies Hybridoma Bank (DSHB) からモショウジョウバエ系統や抗体をいただきました。本当にありがとうございました。

最後に、これまでの私の研究生活を支えてくれた両親に心より感謝いたします。

本学位論文は以下の学術論文の内容に基づいて書かれたものである。

Yuta Takayama, Reina E. Itoh, Taiichi Tsuyama, and Tadashi Uemura

Age-dependent deterioration of locomotion in *Drosophila melanogaster*

deficient in the homolog of *Amyotrophic Lateral Sclerosis 2*

Genes to Cells, in press, 2014

平成 26 年 2 月 18 日

高山雄太

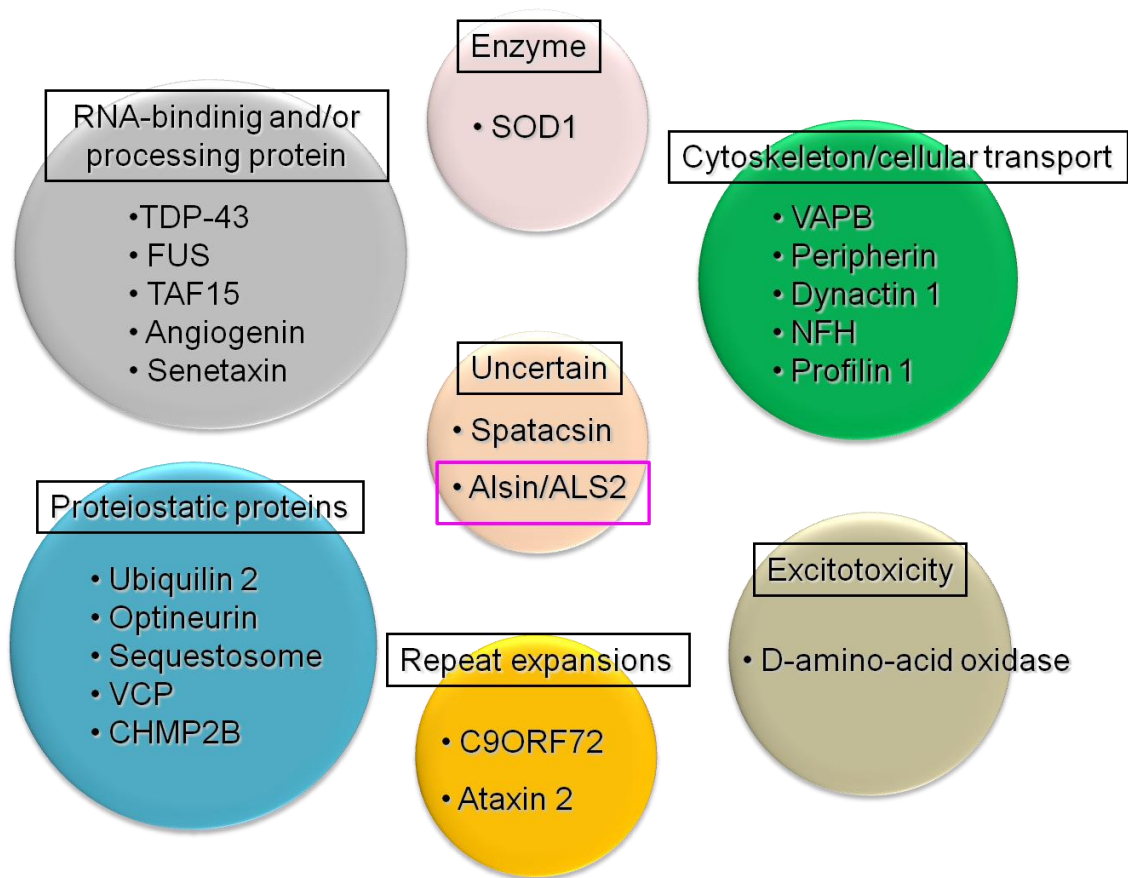
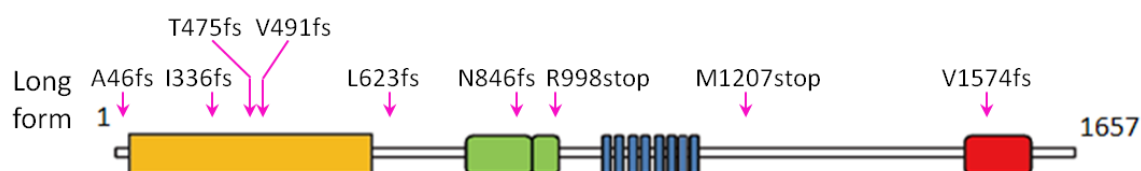


Figure 1 これまでに同定されてきた家族性 ALS 原因遺伝子とその分子機能

家族性 ALS と孤発性 ALS の原因遺伝子のリストである。家族性 ALS はほとんどの場合常染色体優性遺伝の形式をとる。一方、Alsin/ALS2（赤で示したボックス）と Spatacsin の欠損は劣性遺伝の形式をとる MNDs の原因となる。図中の略号を以下に示す。TDP-43: TAR DNA-binding protein 43; TAF15: TATA-binding protein associated factor 15; VAPB: Vesicle-associated membrane protein-associated protein B and C; NFH: Neurofilament heavy chain; SOD1: Superoxide dismutase 1; VCP: Valosin-containing protein; CHMP2B: Charged multivesicular body protein 2b; C9ORF72: Chromosome 9 open reading frame 72. Robberecht and Phillips (2013) を改変した。

A



B

Reference	Motor coordination	Motor learning	Locomotion activities	Anxiety	Running speed
Cai et al., 2006	Decrease	Decrease	NS	Increase	NA
Hadano et al., 2006	Decrease NS	NA	NS	NA	NA
Devon et al., 2006	NS	NA	Decrease ¹	NA	NA
Yamanaka et al., 2006	Decrease	NS	NS	NA	Decrease
Julien et al., 2008	Decrease	NA	NA	NA	NA
Deng et al., 2007	Decrease	NA	NA	NA	NA

NS = Not statistically significant; NA = data not available

¹ May relate to higher anxiety-induced reduction of exploratory activity

Figure 2 ALS2 のドメイン構造図と ALS2 ノックアウトマウスの特徴

(A) ヒト ALS2 タンパク質のドメイン構造を示している。矢印はこれまでに同定されたの突然変異を示している。

(B) ALS2 ノックアウトマウスの行動レベルでの表現型のまとめを示す。NS: Not statistically significant; NA: data not available. Cai et al (2008) を改変した。

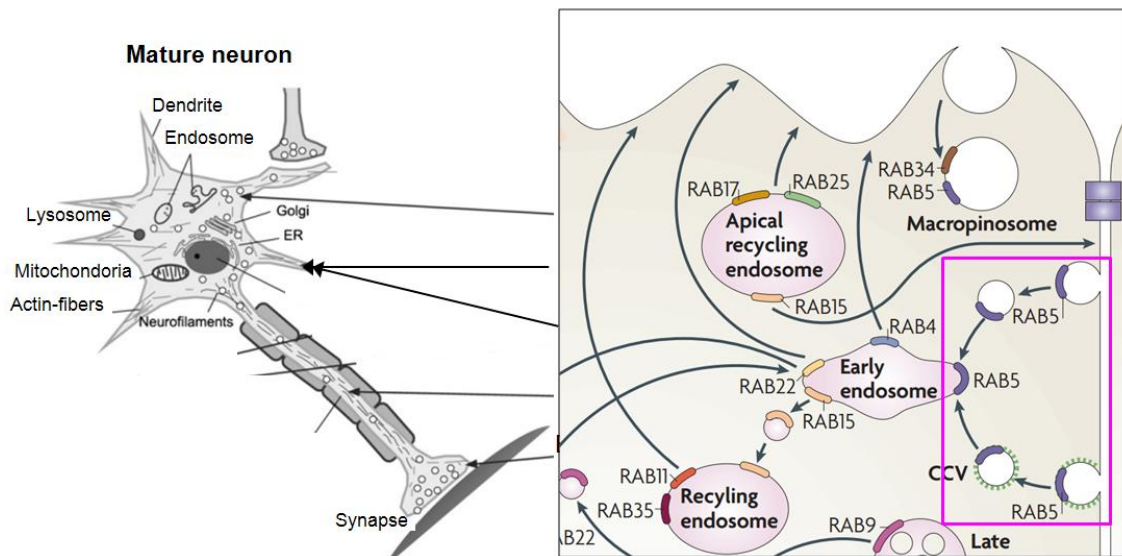


Figure 3 ALS2 が活性を制御する Rab5 タンパク質の機能

（左側）成熟した運動神経の模式図。成熟した神経細胞は複数の樹状突起と一本の軸索を伸ばす。Hadano et al (2007) を改変した。

（右側）細胞における一部の Rab タンパク質の局在と機能。細胞内の細胞小器官同士の複雑なネットワークのほとんどすべての局面で、Rab タンパク質は重要な役割を果たしている。その中でも Rab5 タンパク質は細胞膜や初期エンドソームに局在し、エンドサイトーシスやエンドソーム同士の融合を制御するタンパク質である（赤枠）。ALS2 はこの Rab5 の活性制御を通じて、エンドソームの融合と成熟を調節していると考えられている。Stenmark (2009) を改変した。

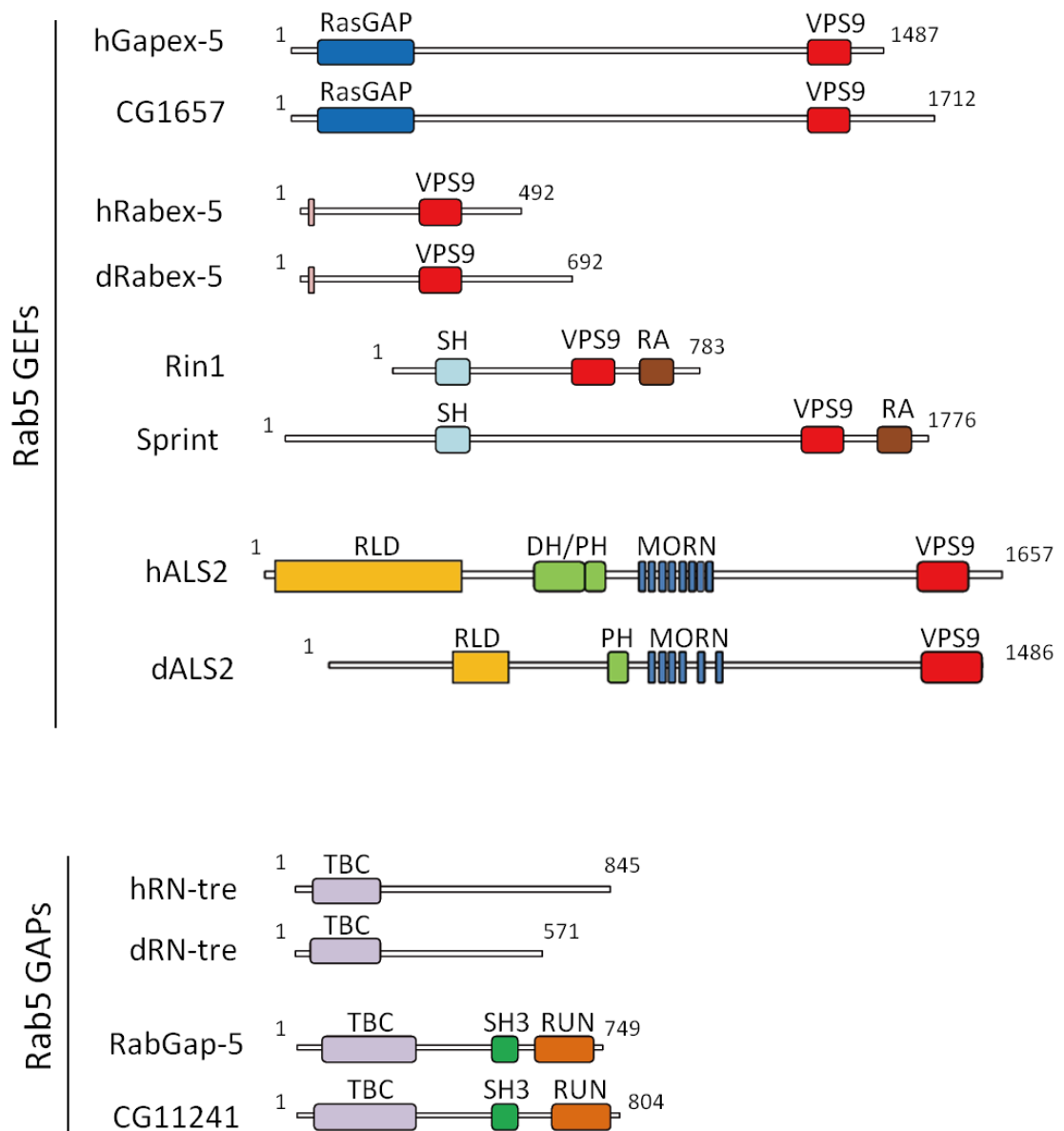


Figure 4 ヒトとショウジョウバエの Rab5-GEFs と GAPs

ヒト Gapex-5 とそのショウジョウバエホモログの CG1657 は RasGAP ドメイン（青色のボックス）と VPS9 ドメイン（赤色のボックス）を有する。Rabex-5 と dRabex-5 には A20-like zinc finger（ピンク色のバー）と VPS9 ドメインを有する。Rin1 とそのショウジョウバエホモログの Sprint は Src homology 2 ドメイン（SH2; 水色のボックス）、VPS9 ドメイン、そして RA ドメイン（茶色のボックス）を有する。ヒト ALS2 は 5 つの

RCC1-like repeats (amino acids 93-122, 109-165, 170-216, 527-574,そして 579-625) からなる RCC1-like ドメイン (RLD)、Dbl homology ドメイン (DH; amino acids 695-882)、pleckstrin homology ドメイン (PH; amino acids 935-1003)、7 つの MORN モチーフ (amino acids 1049-1071、1072-1094、1100-1122、1123-1143、1151-1166、1198-1220、そして 1221-1244)、そして VPS9 ドメイン (amino acids 1552-1654) を有する。dALS2 は 2 つの RCC1-like repeats (amino acids 258-361 と 308-361) からなる RLD ドメイン、PH ドメイン (amino acids 617-719)、6 つの MORN repeats (amino acids 744-765、766-786、789-805、817-835、839-855、そして 863-855)、そして VPS9 ドメイン (amino acids 1373-1481) を有する。Pfam を用いて dALS2 のドメイン予測をしたが、DH ドメインは検出されなかった。

RN-tre と RabGap-5 は共通して Tre-2, Bub2, and Cdc16 ドメイン (TBC ドメイン; 紫色のボックス) を有する。RabGap-5 と そのショウジョウバエホモログ、CG11241 は Src homology 3 ドメイン (SH3 ドメイン; 緑色のボックス) と RUN ドメインを有する。

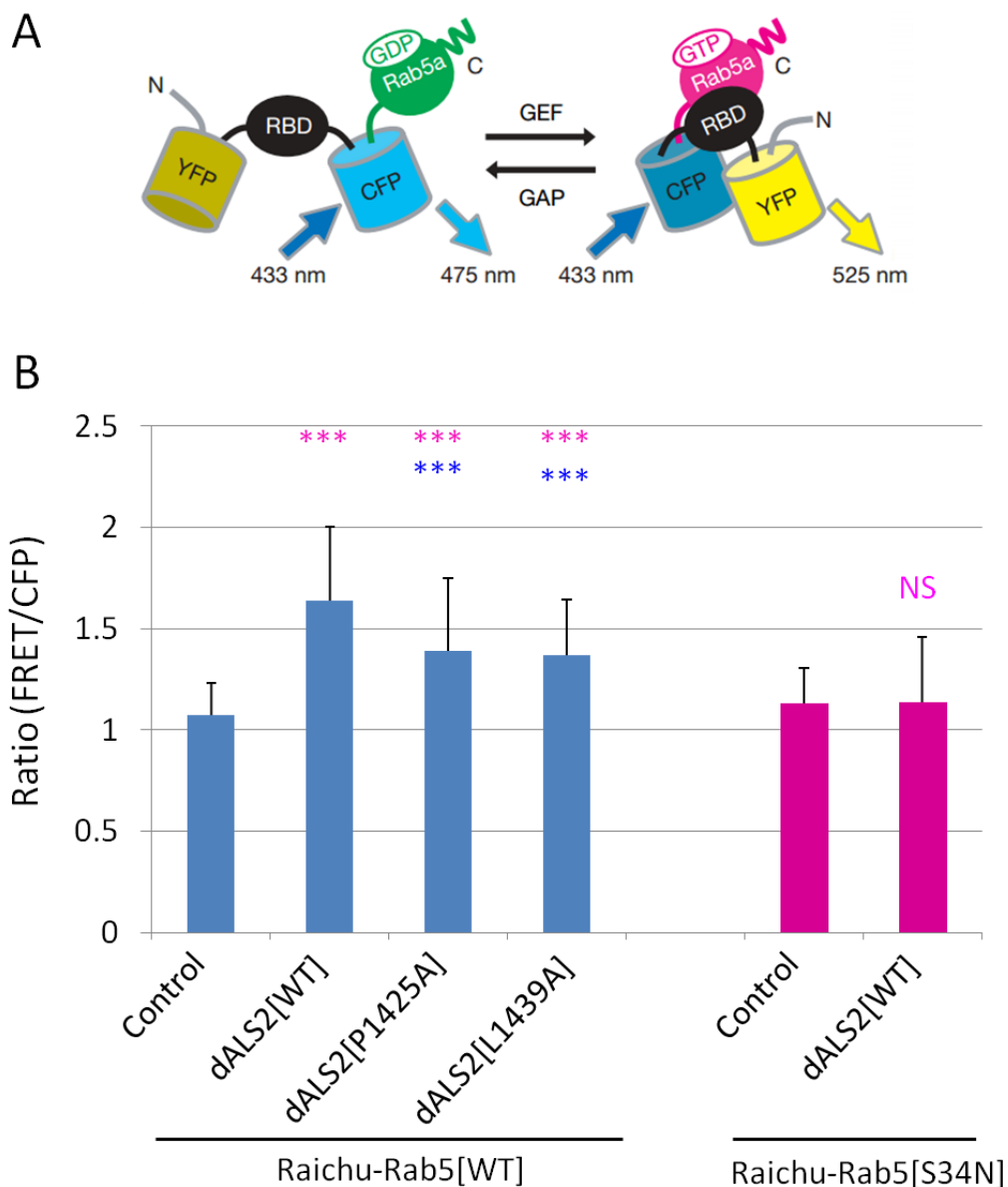


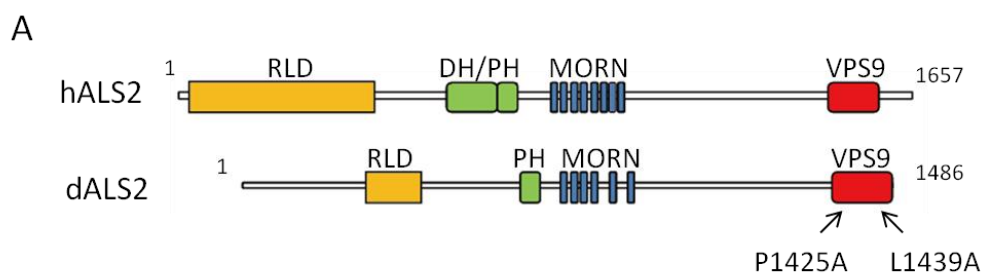
Figure 5 dALS2 は Rab5 の GEF 活性を示す

(A) Rab5 の活性化検出用 FRET プローブ (Raichu-Rab5) の模式図。左は GDP 結合型を、右は GTP 結合型を示す。このプローブはアミノ末端側から、改変型黄色蛍光色素 (YFP) である Venus、初期エンドソームタンパク質 EEA1 のアミノ末端側の Rab5 結合ドメイン (RBD)、改変型シアン蛍光タンパク質 (CFP) である SECFP、そしてヒト Rab5a をタンデムに繋げて設計されている。プローブ内の Rab5 が GEF の作用で GTP 結合型に

なると 525 nm/475 nm の蛍光強度比で示される FRET 効率が上昇する。
Kitano et al. (2008) を改変した。

(B) S2 細胞を用いた dALS2 の GEF 活性測定。1 回の測定で 70 細胞以上を解析した。それぞれの dALS2 タンパク質と野生型 FRET プローブ (Raichu-Rab5[WT])、あるいはネガティブコントロール用プローブ (Raichu-Rab5[S34N]) を共発現させ、FRET/CFP の蛍光強度比を決定した。詳細は本文に記述している。エラーバーは標準偏差を示す。

Raichu-Rab5[WT] を発現させて得られたデータの検定は *** ($P < 0.001$; ANOVA with Bonferroni) で示し、Raichu-Rab5[S34N] を発現させて得られた 2 つの試料間の P 値は 0.852 (student's t-test) だった。実験を 3 回繰り返し、いずれも同じ傾向を示した。どの実験でも Raichu-Rab5[WT] と dALS2[WT] を共発現させると、FRET 効率は 40% 以上上昇した。全てのプラスミドは私（高山）が作製し、FRET 測定実験は同じ研究室に所属する津山泰一氏によって行われた。



B

		20	40	60	
hGapex-5	-----	WPSQSEIRTISAKYKTPRDRVOCILRMCSSTMNLLSLANEDSVPG--	ADDEV	50	
CG1657	-----	QEYLGEAPWTFPQQQCHMAAYKTPREKLOCIINCISSTMSLLRMSS-GRVPA--	ADDEL	57	
hRabex-5	-----	KAITDIIEMDSKRVPRDKLACTKCSKHTFNAIKITK-NEPAS--	ADDFL	47	
CG9139	-----	AISELVGIDSYYSPOEKLQCTWRCCRHFELLKRAT-GGPAS--	ADDFL	46	
hRin1	-----	PVELEQVRQKLOLRITYSPSAQVKRLLOACKLLYMAIRTQE-GEGAG--	ADEFL	52	
Spr-G	-----	LRLIANLLWRLOEAELEPDKHLEFLCVISTVEDATGCPR-GQQLG--	ADDFL	49	
* [hALS2	-----	FASVECLQIQISTTFTPSDKLKVITQOTFEELISQSVLASLHEDFLWS-MDDL	FL	51	
CG7158	-----	FVESVQTLKELQEKFSPODMETVHORSTQLLTEAYEHAMAANAQNLNEDNMI		52	

		80	100	120	
hGapex-5	-----	PVTVFVLKGNPFCILSTVOYISSFYA-----SCLSGESNWWWMOFTAAVEFKTID--		102	
CG1657	-----	PVLIYVIMANPEYILSTVEYISCFLG-----KKLECEDEFYWLFGSVVKFKTMDY--		110	
hRabex-5	-----	PVLIYVILKGNPFCILSTVOYISCFYF-----RMTGCDGYFFNLCCEVAFHEKLD--		102	
CG9139	-----	PALFVVLKGNPFCILSTVQYISCFYF-----RMTSGESGYFFNLCCEVAFHEKLD--		100	
hRin1	-----	PLSLVLAHCDLEPILLEAEYMSLELEP-----SLTCEGGYYLALSLASLALLSGLGQA--		108	
Spr-G	-----	PVLYVVLAKCGFVCGEIEAEFMWGLLOP-----TLNCEGPGYYLALCSLQVQLKTFMA--		103	
* [hALS2	-----	PVFLYVVLRRF--VNGSEVHLIEDLMDP-----YHQHCEQGIMEPLKACYQHQREKL--		105	
CG7158	-----	PLTMTLMRRF--HGAELALLDDLGGPNFQAEMLGAGYCYTLKAYEHVTS-----		107	

hGapex-5	-----	:	-
CG1657	-----	:	-
hRabex-5	-----	:	-
CG9139	-----	:	-
hRin1	TLPLSPVQELR	:	119
Spr-G	-----	:	-
* [hALS2	-----	:	-
CG7158	-----	:	-

Figure 6 ヒトとショウジョウバエの ALS2 のドメイン構造図と VPS9 ドメインのアミノ酸配列

(A) ヒト ALS2 とショウジョウバエ CG7158 (dALS2) のドメイン構造を示す (Figure 4 も参照のこと)。dALS2 の VPS9 ドメインの中に保存されたアミノ酸をアラニンに置換した (P1425A と L1439A)。

(B) ヒトとショウジョウバエの Rab5 GEFs が共通して持つ VPS9 ドメインのアミノ酸配列を比較した。ヒト ALS2 とショウジョウバエ CG7158 をアスタリスクで示した。8つの GEFs すべてに保存されたアミノ酸を黒色ボックスと白字で、5つから7つの GEFs で保存されたアミノ酸を灰色ボックスと白字で示した。3つから4つの GEFs に保存されたアミノ酸は、灰色ボックスと黒字で示している。赤色のボックスは、本研究で置換したアミノ酸を示している。

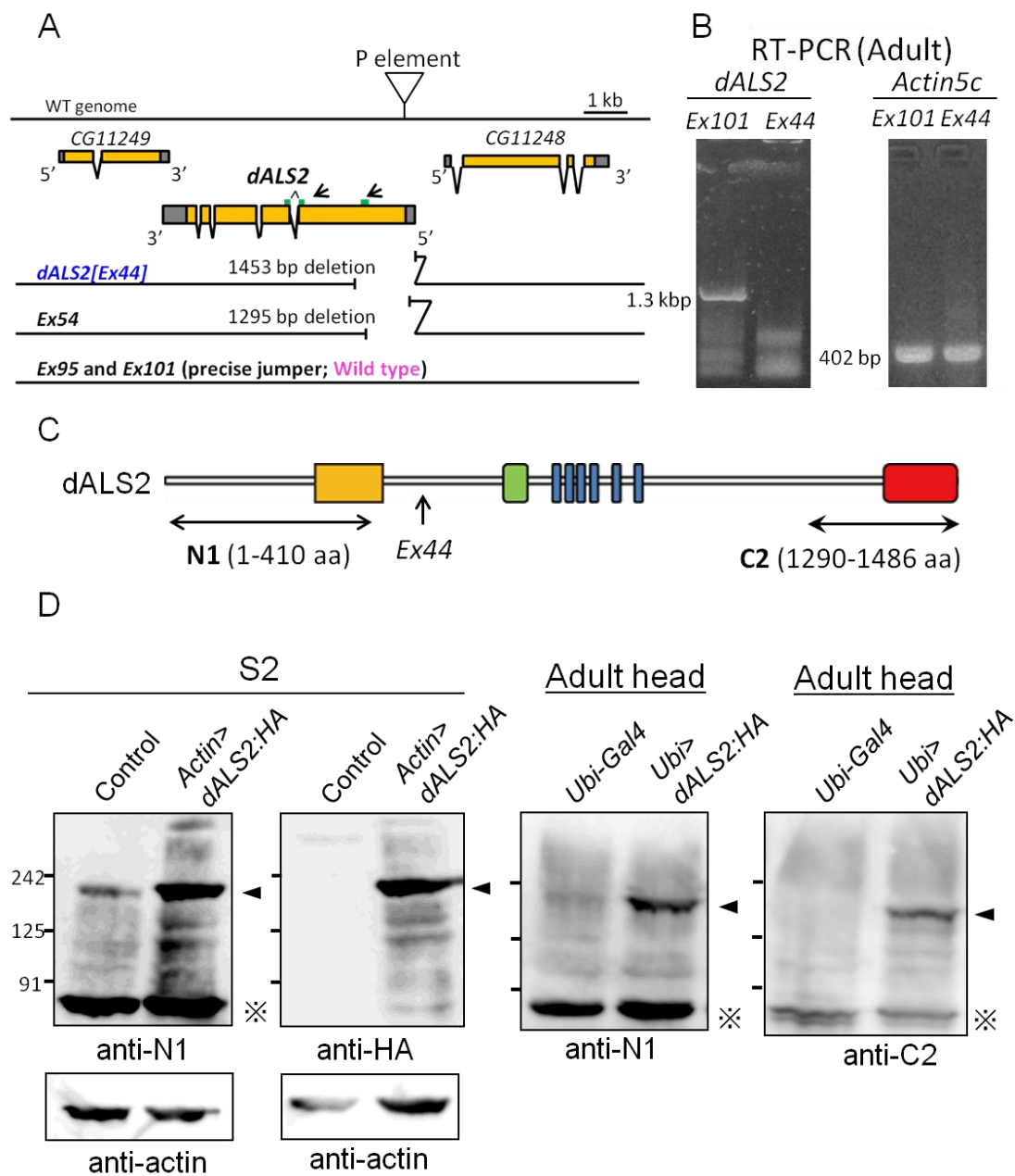


Figure 7 dALS2 近傍のゲノム構造図と dALS2 の発現の検出

(A) dALS2 の exon/intron 構造と本研究で分離した dALS2 突然変異体アレルのゲノム構造を示す。オレンジのボックスは coding sequence を、グレーのボックスは非翻訳領域を示す。三角形は本研究で用いたトランスポゾン P 因子の挿入位置を示す。P 因子はジャンプアウトする際に、周囲のゲノム配列を欠失させることがあるので、この性質を利用して突然変異を分離

した。個々のアリルで欠失したゲノム領域を示した。黒矢印で指した緑色の線は、RT-PCR 解析で用いたプライマーセットを示す。

(B) RT-PCR 解析による *dALS2* mRNA の検出。周囲のゲノム配列を欠失することなく P 因子が切り出された野生型 (*Ex101/Ex101*) からは *dALS2* mRNA を検出し、*dALS2* 変異体 (*Ex44/Ex44*) からは検出されなかった。コントロールとして *Actin 5C* mRNA を用いた。

(C) *dALS2* のドメイン構造と、抗体を作製する際に用いた抗原 (N1 と C2)。*dALS2* タンパク質を検出するため、アミノ末端側を認識する抗体 (N1) とカルボキシル末端側を認識する抗体 (C2) を作製した。アリル *Ex44* では、アミノ末端から少なくとも矢印で示した位置までに相当する領域を欠損する。

(D) S2 細胞の破碎液からの *dALS2* タンパク質の検出 (左側) と成虫頭部からの *dALS2* タンパク質の検出 (右側)。S2 細胞に pDA-Gal4 のみを (control)、あるいは pDA-Gal4 と pUAST-*dALS2*[WT] (*Actin>dALS2:HA*) を導入した (詳細は第 4 章に記した)。右側のブロットでは、以下の遺伝子型の成虫を用いて破碎液を調製した。

Ubiquitin-Gal4/UAS-mmRFP (*Ubi-Gal4*)

Ubiquitin-Gal4/UAS-3HA:dALS2[WT] (*Ubi>dALS2*)

黒の矢尻は *dALS2* タンパク質を、アスタリスクは *dALS2* とは無関係のバンドを指す。

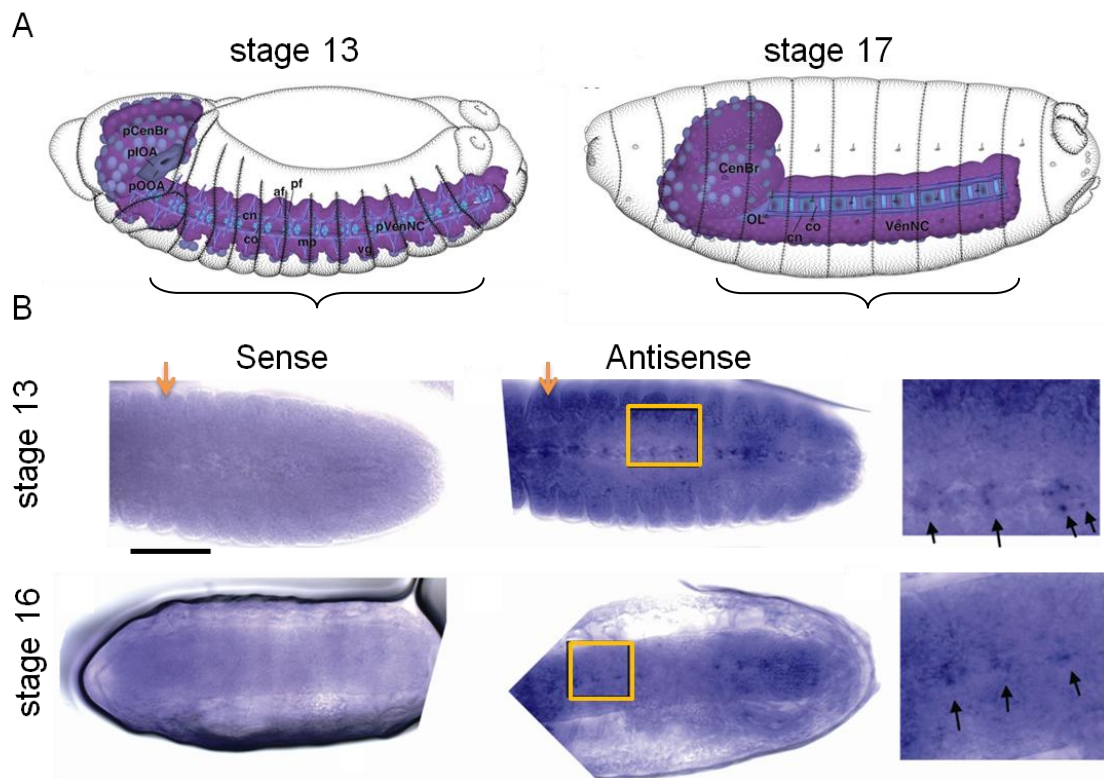
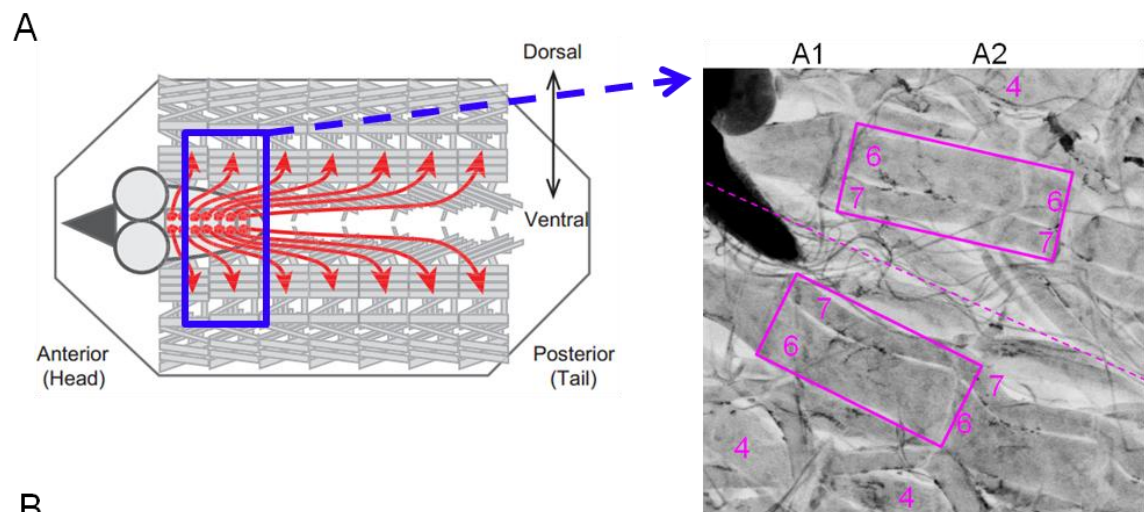


Figure 8 *dALS2* の発現パターン

(A) stage 13 と stage 17 の胚の模式図。横から見た像で、左が前側で右が後ろ側。紫色の器官は中枢神経系全体を示す。括弧は腹側神経節を示し、脊椎動物の脊髄に相当する。

Fly Atlas (<http://www.sdbonline.org/sites/fly/atlas/0809.htm>) より引用。

(B) *dALS2* プローブを用いた in situ ハイブリダイゼーションの結果。stage 13 と stage 16 の胚を用いた。腹側正面から見た像で、左が前側で右が後ろ側になっている。センスプローブでハイブリダイズさせた胚の像（左端）。アンチセンスプローブでハイブリダイズさせた胚の像（中央と右端）。中央の像で、ボックスで囲った領域を右端に拡大した。表皮（オレンジの矢印）や腹側神経節（ボックス）を含む幅広い領域で、*dALS2* の発現が検出された。神経節内の一部の細胞（細胞種は未同定）で、より強いシグナルが検出された（右端の像の黒矢印）。スケールバーは 50 μm 。



B

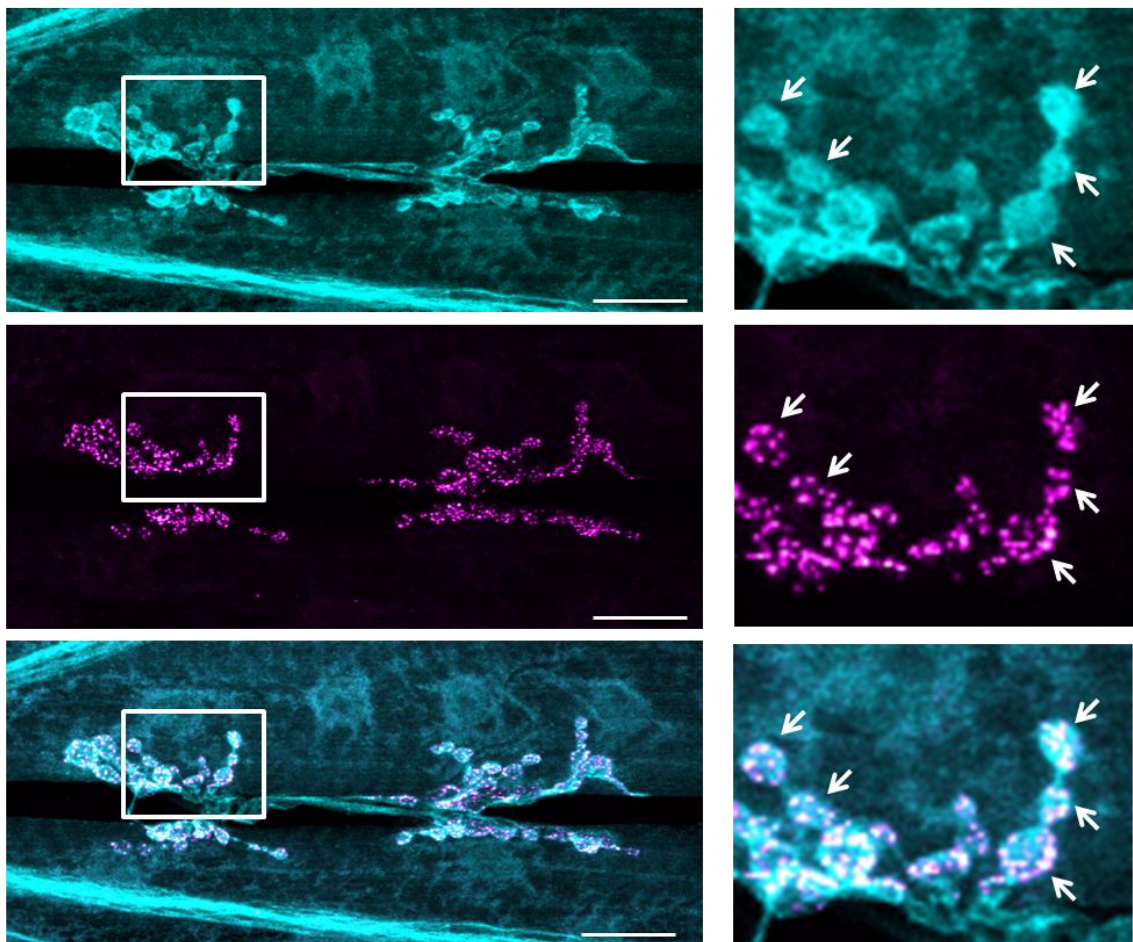


Figure 9 ショウジョウバエ神経筋接合部 (neuromuscular junction/NMJ) の基本構造

(A) 幼虫を背側正中線に沿って前後方向に切り、開いた状態にした模式図。腹部神経節にある運動神経は、その軸索(赤矢印)が末梢に向かって伸張し、規則正しく各筋肉に投射して神経筋接合部 (neuromuscular junction/NMJ) を形成する (Kohsaka et al., 2012)。右の像は、青枠付近の腹側領域を観察したもので、HRP 抗体で神経細胞の細胞膜を標識している。腹部体節では半体節あたり 30 本の筋肉が規則正しく配列されており、muscle 1 から muscle 30 まで名づけられている。本研究では主に、muscle 4 と muscle 6/7 に絞って解析を行った。A1: abdominal 1 (腹部第一体節)、A2: abdominal 2 (腹部第二体節)。

(B) muscle 6/7 の NMJ の代表例を示す。上から順に、HRP 抗体で軸索の細胞膜を標識した像、Bruchpilot (Brp) 抗体で軸索前末端にある active zone を染色した像、そしてこの2つをマージさせた像を示す。白枠で囲んだ領域を拡大した像を右に示す。粒状で、かつ Brp 陽性な構造を bouton とみなし、個数を調べた。白矢印は個々の bouton を指す。筋肉面積を定量し、bouton 数を筋肉の面積で補正した値を算出した (Figure 10)。スケールバーは 20 μm 。

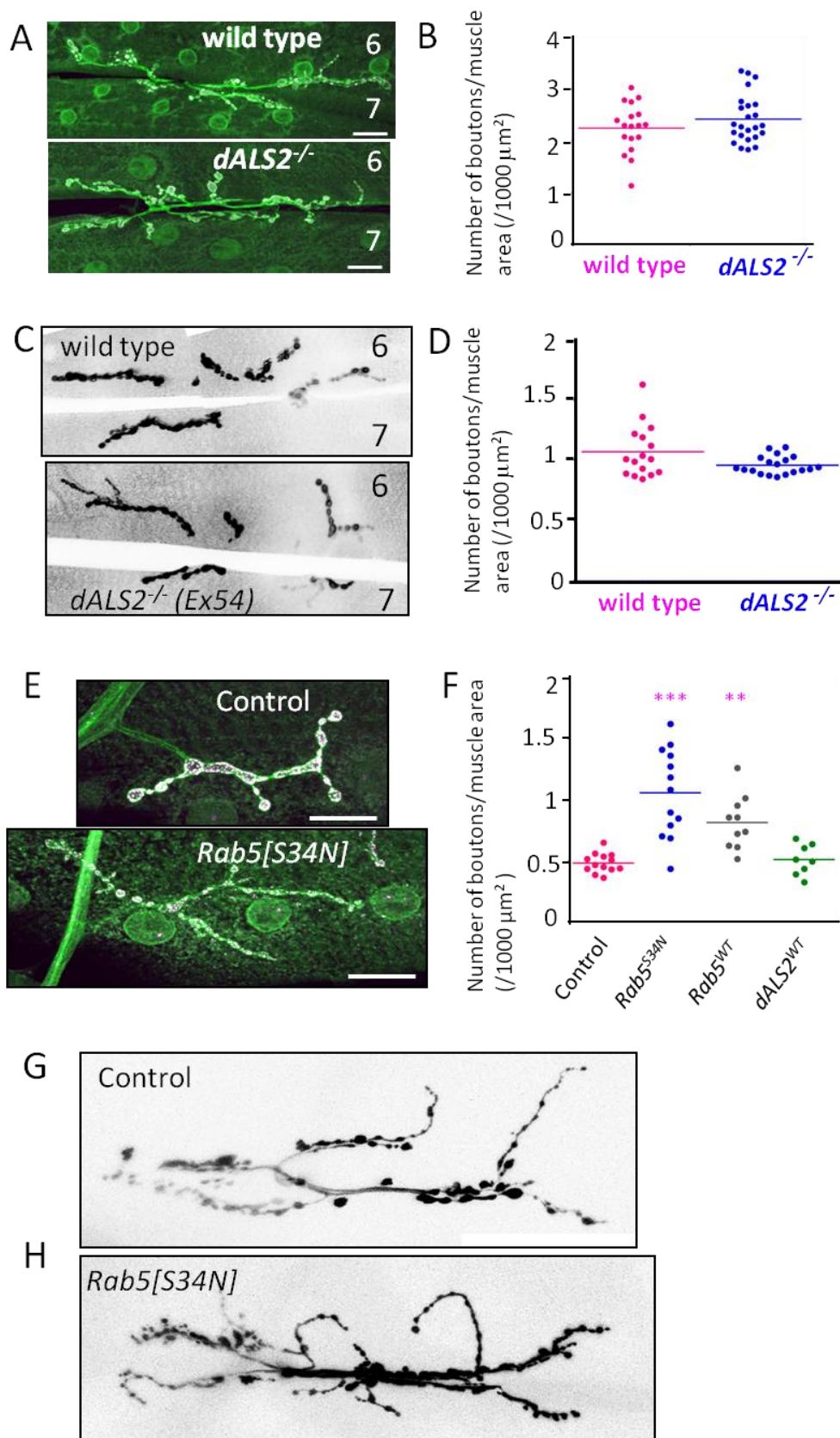


Figure 10 3 齡幼虫の NMJ 表現型

(A, E) 腹部第二体節の muscle 6/7 のプレシナプス構造 (A) と muscle 4 のプレシナプス構造 (E) を示す。いずれも HRP (緑色) と Brp 抗体 (マゼンタ色で示されているが、緑色と重なったところでは白く見えている) で共染色している。スケールバーは 20 μ m。

(C) *Mhc-CD8-Sh:YFP* (Zito et al., 1999) を用いて、muscle 6/7 のポストシナプス構造を可視化した像。

(G, H) 運動神経の軸索を mCD8:GFP で標識し、ライブイメージングした像。*Rab5[S35N]* を運動神経で発現させた個体 (H) とコントロール (G)。腹部第二体節の muscle6/7 を観察している。

(B, D, F) 定量的解析の結果を示す。Bouton 数を投射先の筋肉の面積で補正した。それぞれのバーは平均値を示す。**: $P < 0.01$ ***: $P < 0.001$ (ANOVA with Tukey's HSD posthoc test).

遺伝子型は以下の通りである。

(A, B) *Ex101/Ex101* (wild type), *Ex44/Ex44* (*dALS2*^{-/-})

(C, D) *Mhc-CD8-YFP:Sh/Mhc-CD8-YFP:Sh; Ex101/Ex101* (Control), *Mhc-CD8-YFP:Sh/Mhc-CD8-YFP:Sh; Ex54/Ex54* (*dALS2*^{-/-})

(E, F) *OK371-Gal4/UAS-mmRFP* (Control), *OK371-Gal4/+; UAS-Rab5[S34N]/+* (*Rab5*^{S34N}), *OK371-Gal4/+; UAS-GFP:Rab5[WT]/+* (*Rab5*^{WT}), *OK371-Gal4/UAS-3HA:dALS2[WT]* (*dALS2*^{WT})

(G) *OK371-Gal4 UAS-mCD8:3xEGFP/UAS-mmRFP*

(H) *OK371-Gal4 UAS-mCD8:3xEGFP/+; UAS-Rab5[S34N]/+*

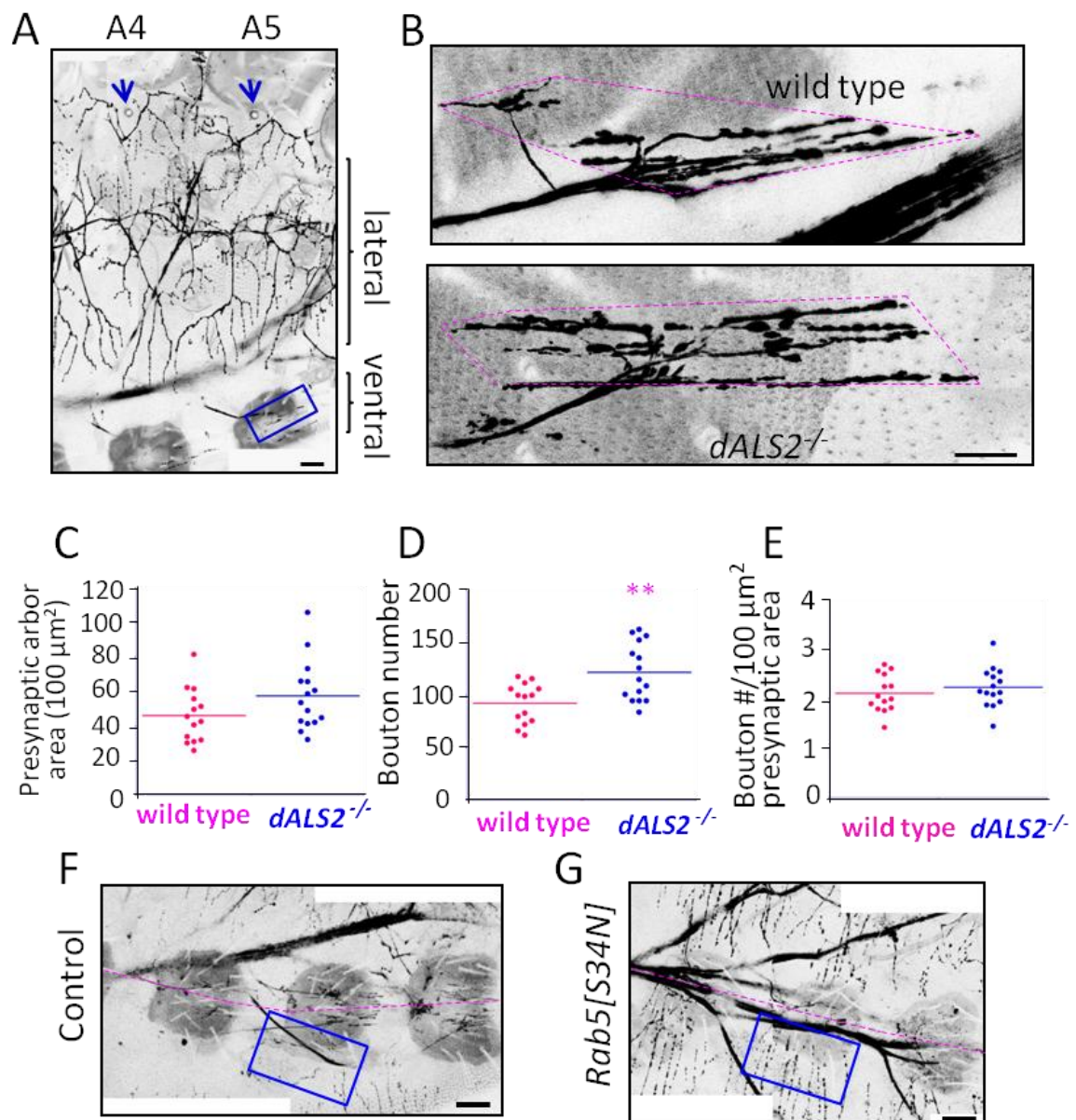


Figure 11 成虫メスの腹部に投射する運動神経軸索末端の表現型

羽化後 3-4 日のメス (A, F, G) と羽化後 2 週齢のメス (B-E) の結果を示す。

(A) 低倍で野生型の側板と腹板に投射する運動神経の軸索を観察した像。青色矢印は気門を示す。A4: abdominal 4 (腹部第四体節)、A5: abdominal 5 (腹部第五体節)。

(B) 腹側領域に投射する軸索を、羽化後 2 週齢の野生型あるいは *dALS* 変異体で観察し、高倍で示した像。A の青枠に相当する箇所を、それぞれ野生

型と *dALS* 変異体で観察した。突起末端をマゼンタの破線で囲い、プレシナプスの面積を定量した。

(C-E) 定量データ。エリアサイズ (C)、軸索あたりの bouton 数 (D)、そしてエリアサイズで補正した bouton 数 (E) を示す。**: $P < 0.01$ (student's t-test).

(F, G) 腹側正中線（マゼンタの破線）付近に投射する軸索末端の観察像。*Rab5*[S35N] を運動神経で発現させた個体 (G) とコントロール (F)。両遺伝子型の青枠で囲った領域に侵入する軸索末端に注目。

遺伝子型は以下の通りである。

(A) *OK371-Gal4 UAS-mCD8:3xEGFP/OK371-Gal4 UAS-mCD8:3xEGFP*

(B-E) *OK371-Gal4 UAS-mCD8:3xEGFP/OK371-Gal4 UAS-mCD8:3xEGFP; Ex101/Ex101* (wild type), *OK371-Gal4 UAS-mCD8:3xEGFP/OK371-Gal4 UAS-mCD8:3xEGFP; Ex44/Ex44* (*dALS2*^{-/-})

(F) *OK371-Gal4 UAS-mCD8:3xEGFP/UAS-mmRFP*

(G) *OK371-Gal4 UAS-mCD8:3xEGFP/+; UAS-Rab5*[S34N]/+

スケールバー： 50 μm (A, F, G) と 20 μm (B)。

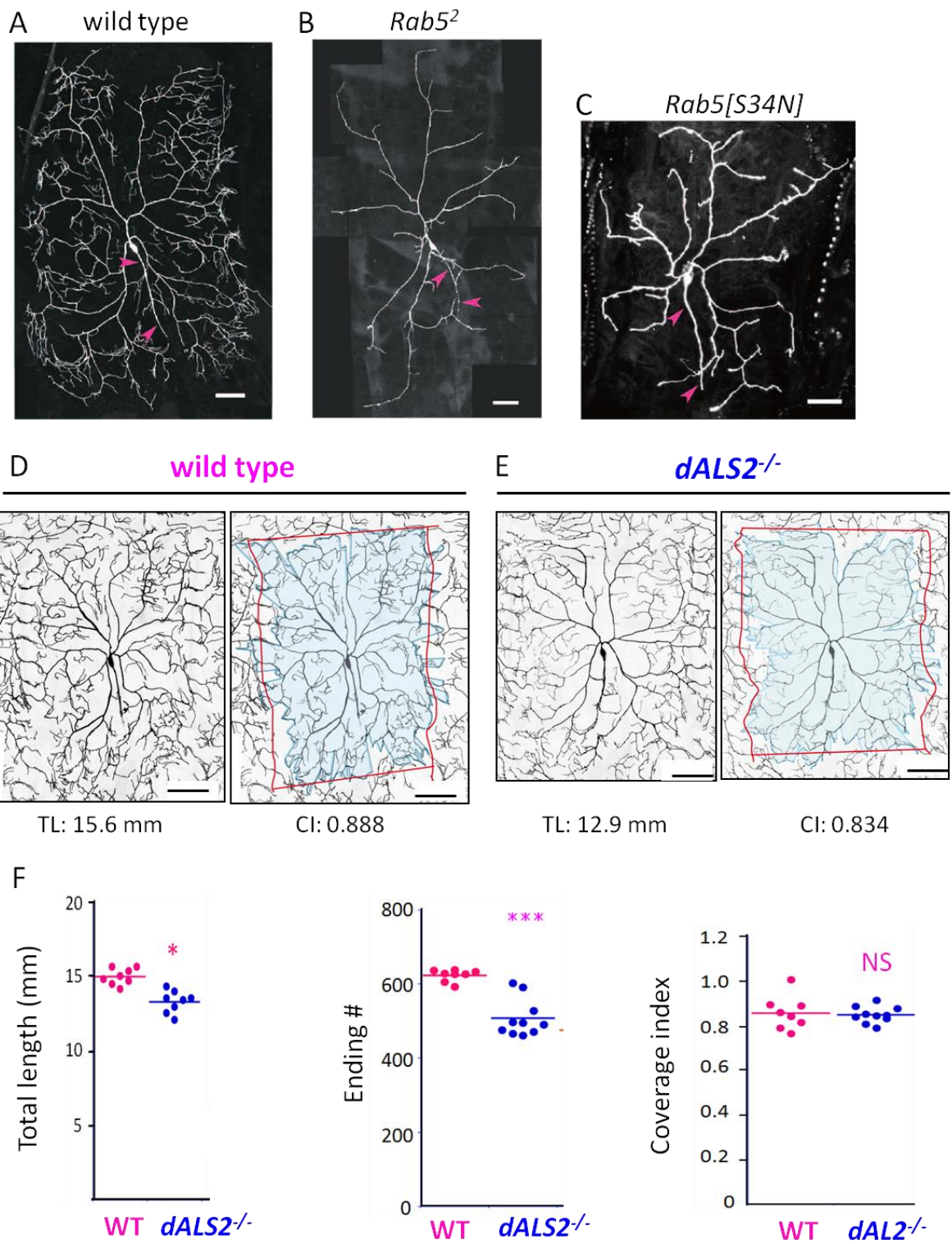


Figure 12 *dALS2* 変異体でのクラスⅣ da neuron の表現型

(A-C) Rab5 の機能を喪失したクラスⅣ da neuron (ddaC) は樹状突起が著しく短くなる。(A) 野生型 ddaC の像。(B) *Rab5²* のホモ接合 ddaC の像。(C) 野生型 ddaC に *Rab5[S34N]* を発現させ、Rab5 の機能を阻害させた ddaC の像。Sato et al (2008) を改変した。

(D, E) 野生型 3 齢幼虫の ddaC の代表例 (D) と *dALS2* 変異体の ddaC の代表例 (E) を示す。元画像の上に、実際に樹状突起で覆われた受容野（水色）と半体節の背側領域（赤枠）を重ねている。突起全長 (Total length/TL) と coverage index (CI) を定量した (Parrish et al., 2009)。用いた遺伝子型は、[*Gr28b.c-Gal4 UAS-mCD8:GFP/+; Ex101/Ex101*] (D) と [*Gr28b.c-Gal4 UAS-mCD8:GFP/+; Ex44/Ex44*] (E) である。

(F) 神経細胞の突起全長（左）、分岐数（中央）、そして coverage index（右）を定量化した。*: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$ (student's t-test).

スケールバーは 100 μm 。

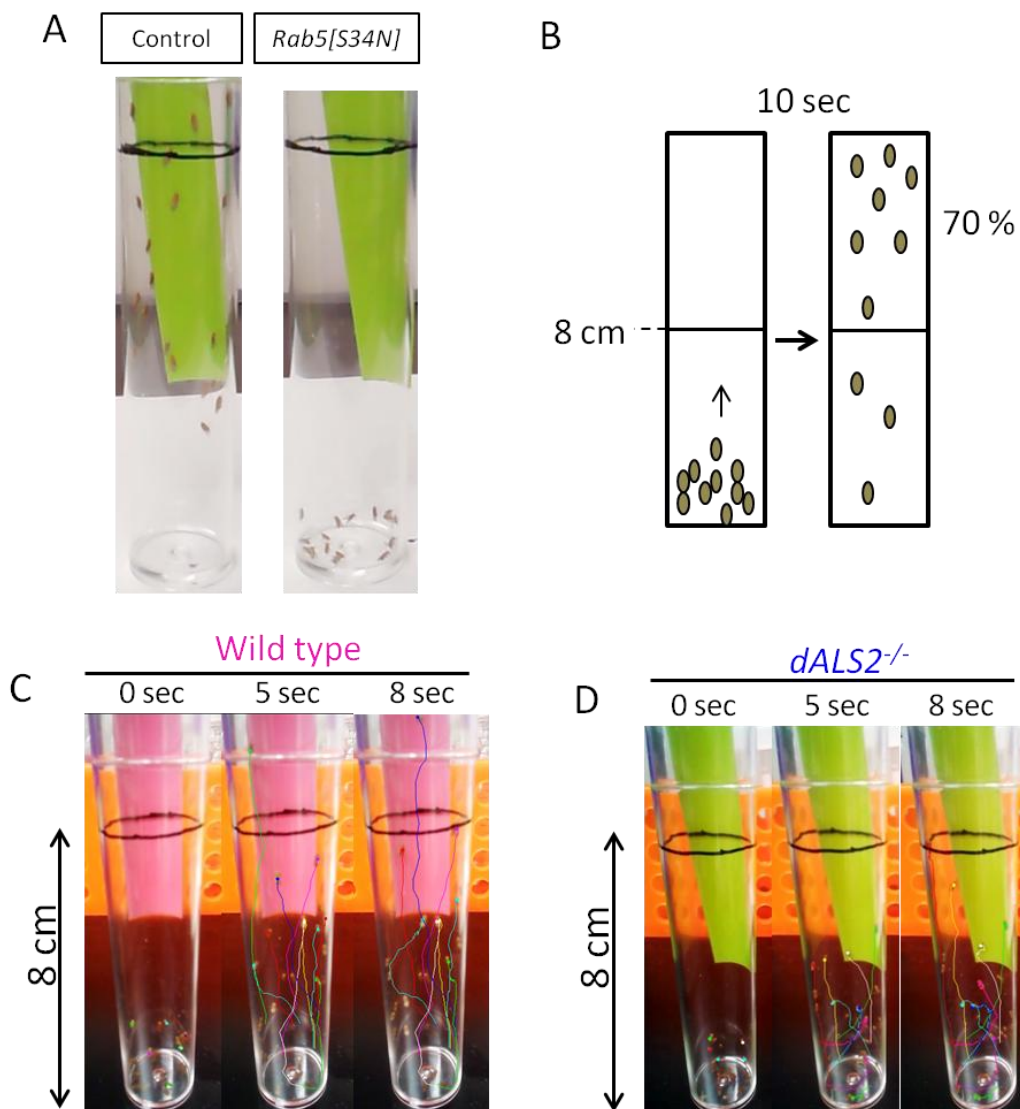


Figure 13 運動能アッセイの一つ Negative geotaxis assay

(A) 成虫をバイアルの底面に落として 5 秒後に撮影した像を示す。コントロール (*OK371-Gal4 UAS-mCD8:3xEGFP/UAS-mmRFP*) の成虫は壁を速やかに登っていく (左側) のに対し、*Rab5[S34N]* を運動神経で発現させた成虫 (*OK371-Gal4 UAS-mCD8:3xEGFP/+; UAS-Rab5[S34N]/+*) はほとんど登ることができない (右側)。(B) Negative geotaxis assay の模式図。この場合では、climbing pass rate は 70% である。(C and D) 羽化後 4 週齢の野生型 (*Ex101/Ex101*) と *dALS2^{-/-}* (*Ex44/Ex44*) の運動能を示す。写真はそ

れぞれ、成虫を底面に落として 0 秒後、5 秒後、そして 8 秒後に撮影した。個々のハエの軌跡を異なる色で示している。

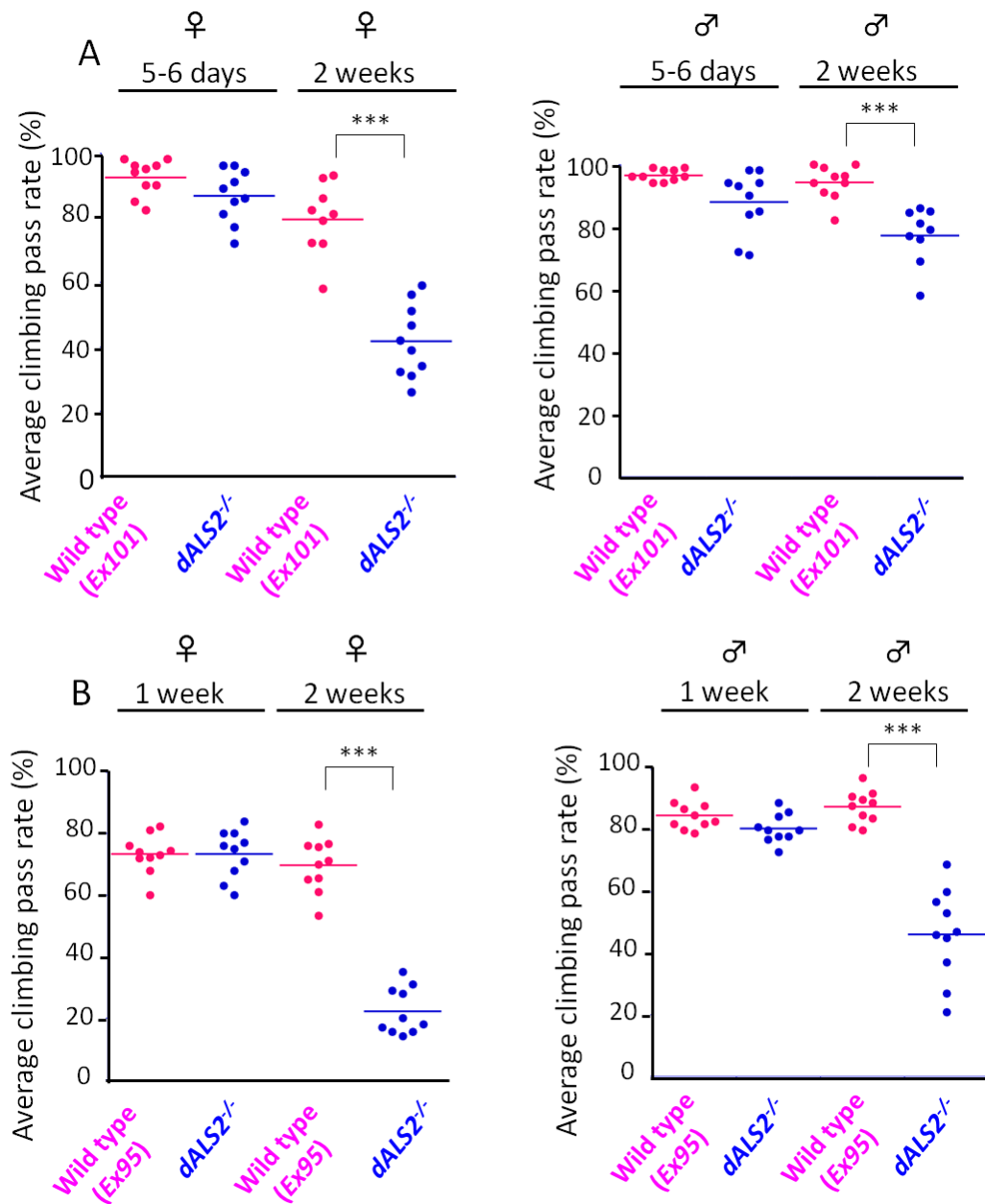


Figure 14 *dALS2* 変異体は加齢依存的に運動能が低下する

オスとメスそれぞれについて各加齢時期に Negative geotaxis assay を行い、Wild type と *dALS2*^{-/-} の運動能を調べた。wild type として *Ex101/Ex101* (A)、または *Ex95/Ex95* (B) を用いた。 *dALS* 変異体として、いずれも *Ex44/Ex44* を用いている (A, B)。*** P<0.001 (student's t-test).

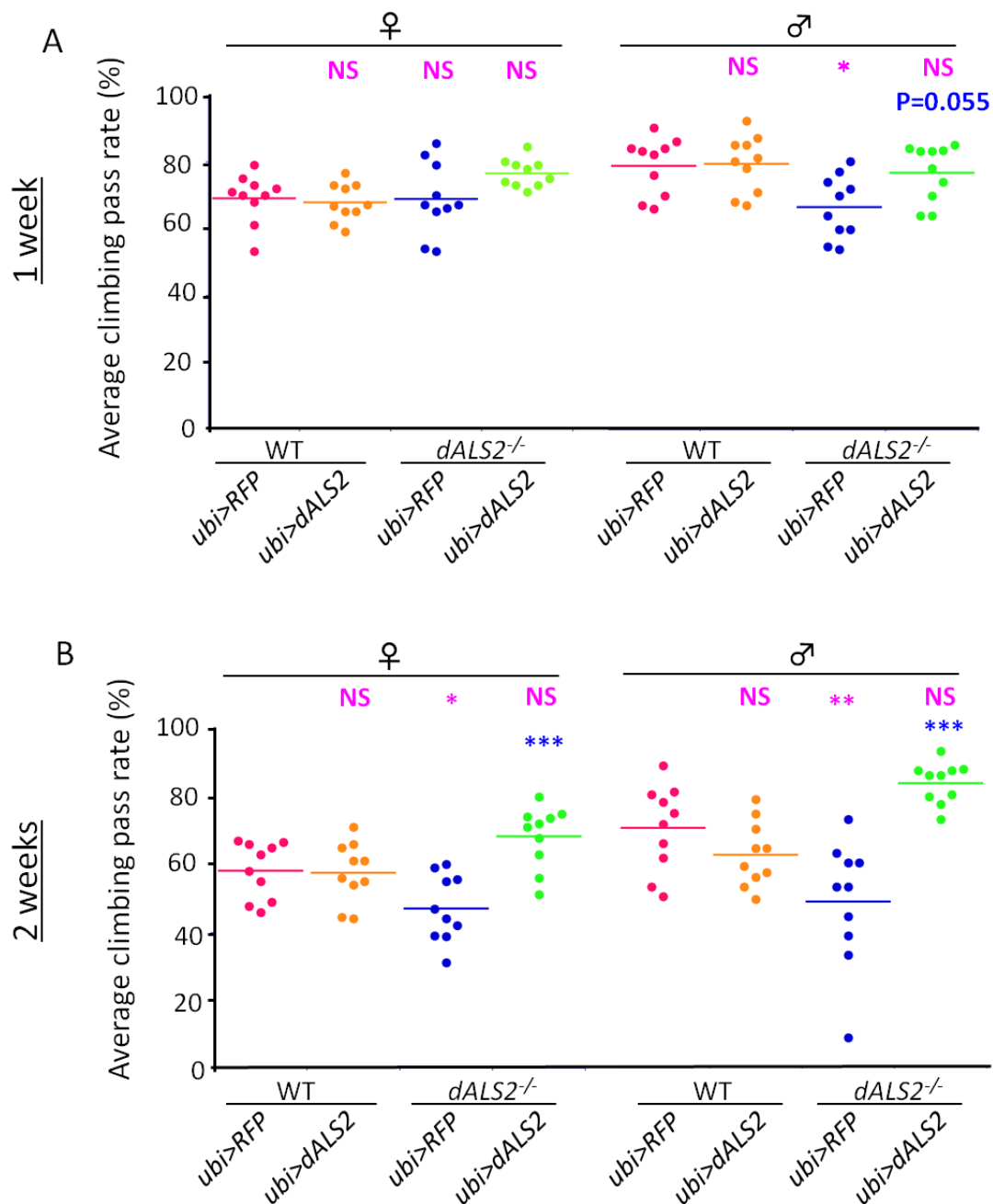


Figure 15 *dALS2* 変異体の幅広い組織で *dALS2* トランスジーンを発現させると、運動能の低下は回復する

Ubi-Gal4 を用いて *dALS2* トランスジーンを広範囲に発現させて、*dALS2*^{-/-} の運動能低下の表現型が回復するかどうか検証した。羽化後 1 週齢 (A) と羽化後 2 週齢 (B) の成虫を用いて、Negative geotaxis assay を行った。用いた遺伝子型は各グラフの左から順に以下のとおりである。

Ubi-Gal4/UAS-mmRFP; Ex101/Ex101 (Ubi>RFP; WT)

Ubi-Gal4/UAS-dALS2; Ex101/Ex101 (Ubi>dALS2; WT)

Ubi-Gal4/UAS-mmRFP; Ex44/Ex44 (Ubi>RFP; dALS2^{-/-})

Ubi-Gal4/UAS-dALS2; Ex44/Ex44 (Ubi>dALS2; dALS2^{-/-})

マゼンタのアスタリスクは野生型 (*Ubi>RFP; WT*) と比べたときに、統計的な有意差があることを示す。青色のアスタリスクは、*dALS2* 変異体

(*Ubi>RFP; dALS2^{-/-}*) と比べたときに統計的な有意差があることを示す。*:

$P < 0.05$; **: $P < 0.01$; NS: Statistically not significant ($P > 0.05$)。分散解析には

ANOVA with Tukey's HSD posthoc test を用いた。グラフの上段右側で、

Ubi>RFP; dALS2^{-/-} と *Ubi>dALS2; dALS2^{-/-}* とを比べると運動能が回復し

ているように見えたが、有意差はなかった。そこで、実際の P 値を付している。

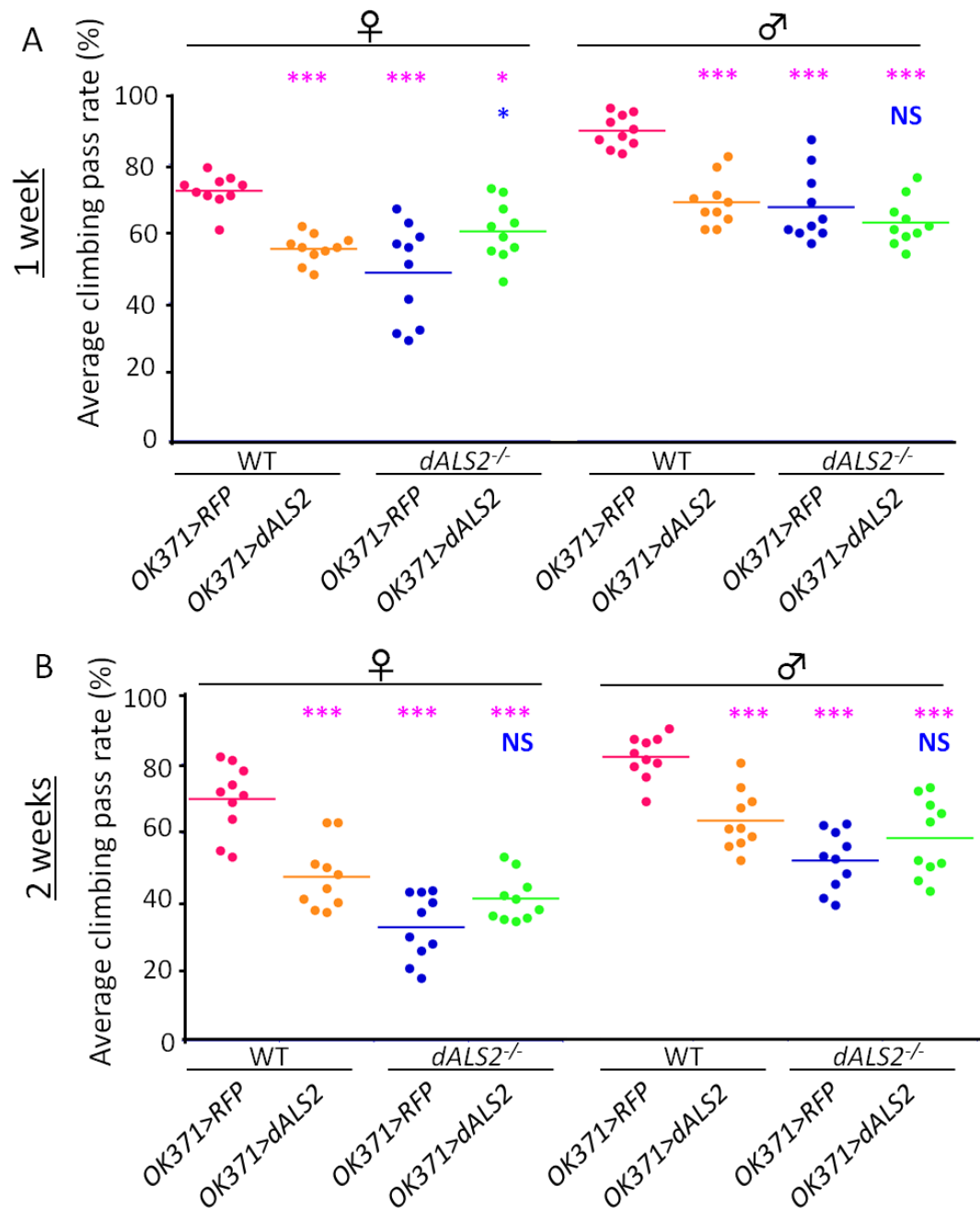


Figure 16 運動神経 Gal4 系統を用いた運動能低下の表現型回復実験

OK371-Gal4 を用いて *dALS2* トランスジーンを広範囲に発現させて、*dALS2*^{-/-} の運動能低下の表現型が回復するかどうか調べた。羽化後 1 週齢 (A) と羽化後 2 週齢 (B) の成虫を用いて、Negative geotaxis assay を行った。用いた遺伝子型は各グラフの左から順に以下のとおりである。

OK371-Gal4/UAS-mmRFP; Ex101/Ex101 (OK371>RFP; WT)

OK371-Gal4/UAS-dALS2; Ex101/Ex101 (OK371>dALS2; WT)

OK371-Gal4/UAS-mmRFP; Ex44/Ex44 (OK371>RFP; dALS2^{-/-})

OK371-Gal4/UAS-dALS2; Ex44/Ex44 (OK371>dALS2; dALS2^{-/-})

マゼンタのアスタリスクは野生型 (*OK371>RFP; WT*) と比べて統計的な有意差があることを示す。青色のアスタリスクは *dALS2* 変異体 (*OK371>RFP; dALS2^{-/-}*) と比べて統計的な有意差があることを示す。 *: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$; NS: Statistically not significant ($P > 0.05$). 分散解析には、ANOVA with Tukey's HSD posthoc test を用いた。

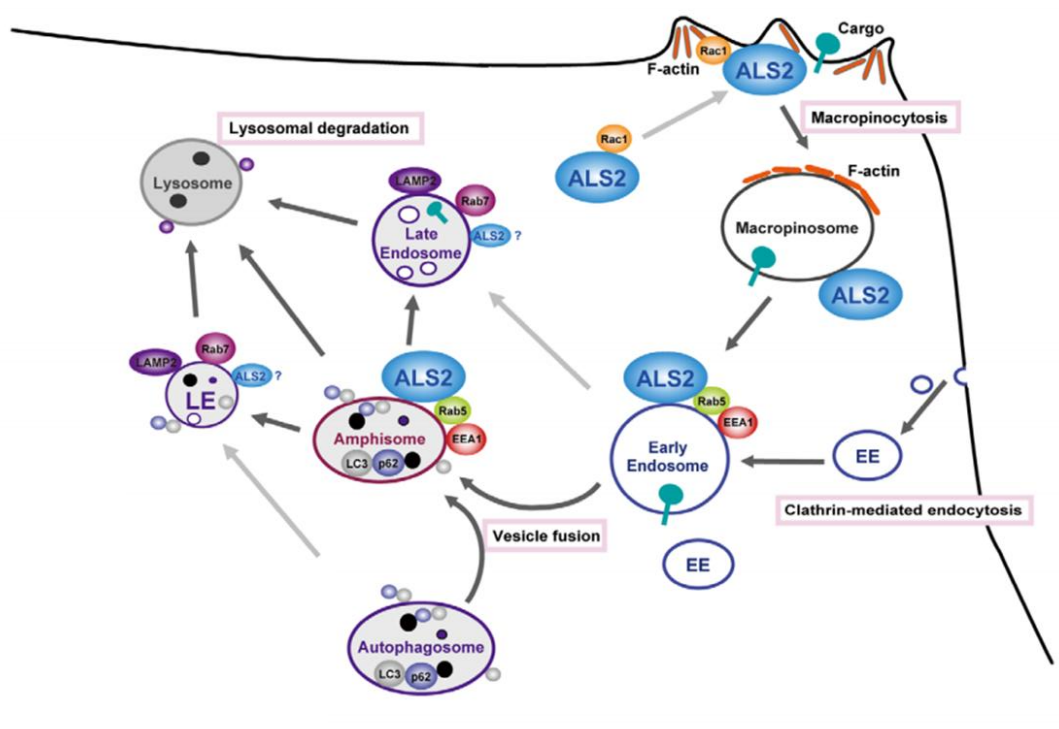


Figure 17 ALS2/alsin のオートファジーにおける分子機能

細胞質において、ALS2 は細胞膜ラッフルに輸送され、そしてマクロピノソーム（図右上）に局在する。そして、そこで新たに形成されるマクロピノソーム上で Rab5 を活性化し、Rab5 のエフェクターである EEA1 やその他のタンパク質（ここでは示されていない）がリクルートされるのを促進している。ALS2 はマクロピノソームや初期エンドソーム (early endosome/EE) の融合や成熟を促していると考えられている。ALS2 はまた、細胞内で p62/LC3 陽性のオートファゴソームにも局在し、アンフィソームの形成を通じてオートファゴソームの成熟にも寄与している可能性が示唆されている。形成されたアンフィソームは後期エンドソーム (late endosome/LE) へと成熟し、最終的にはリソソームと融合する。そこで、ポリユビキチン化タンパク質を含んだ積荷分子が分解される。Hadano et al. (2010) を改変した。

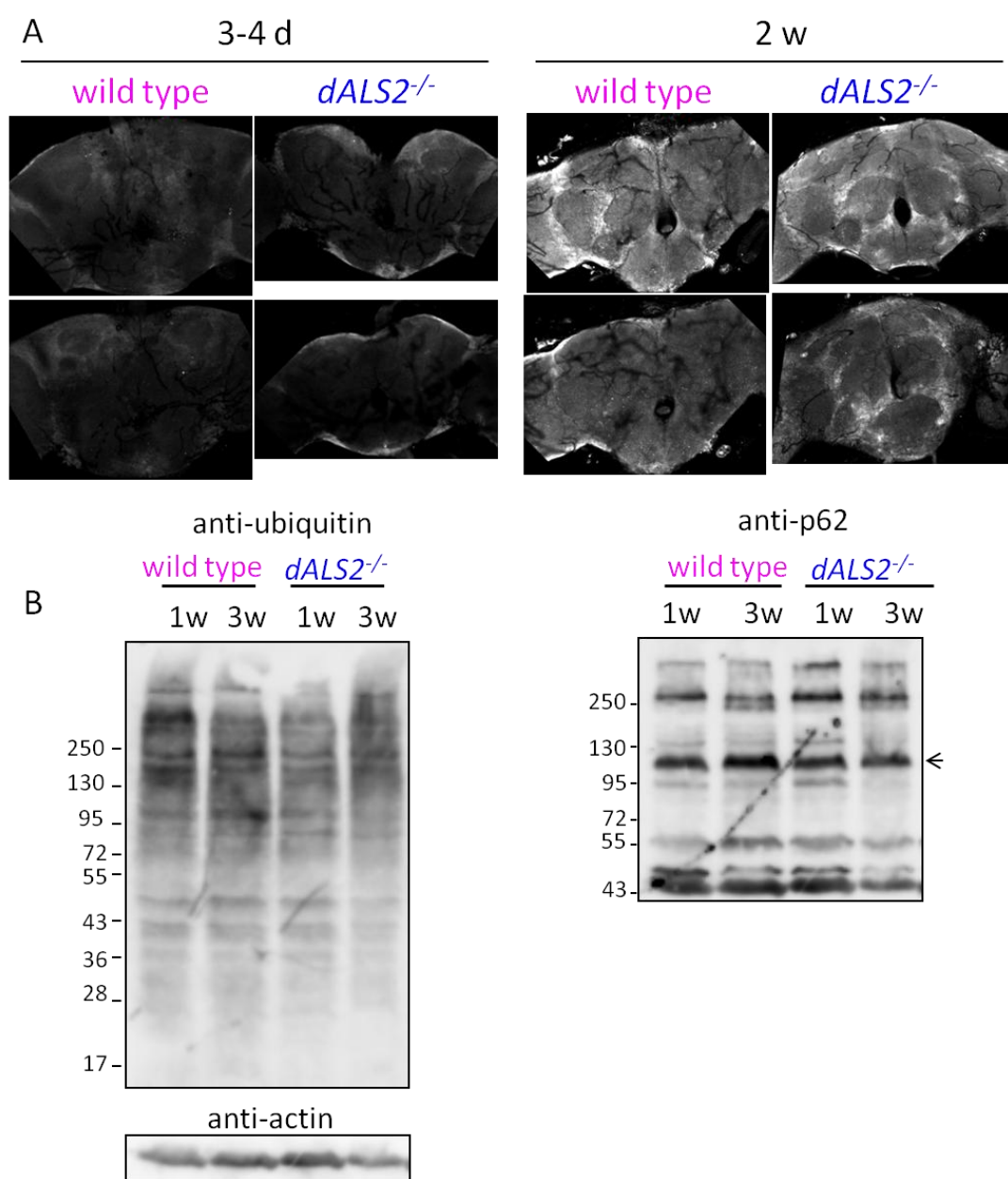


Figure 18 *dALS2* 変異体の加齢化は促進していない

(A) 羽化後 3-4 日と羽化後 2 週齢の成虫脳のホルマリン固定染色像。ポリユビキチンを染色した。(B) 羽化後 1 週齢もしくは 3 週齢の成虫頭部から調製した破碎液を泳動し、ポリユビキチン抗体、アクチン抗体、そして p62 抗体を用いて各タンパク質の検出を試みた。右のプロット像の矢印は、p62 のバンドを指している。遺伝子型は *Ex101/Ex101* (wild type) と *Ex44/Ex44* (*dALS2*^{-/-}) を用いた。

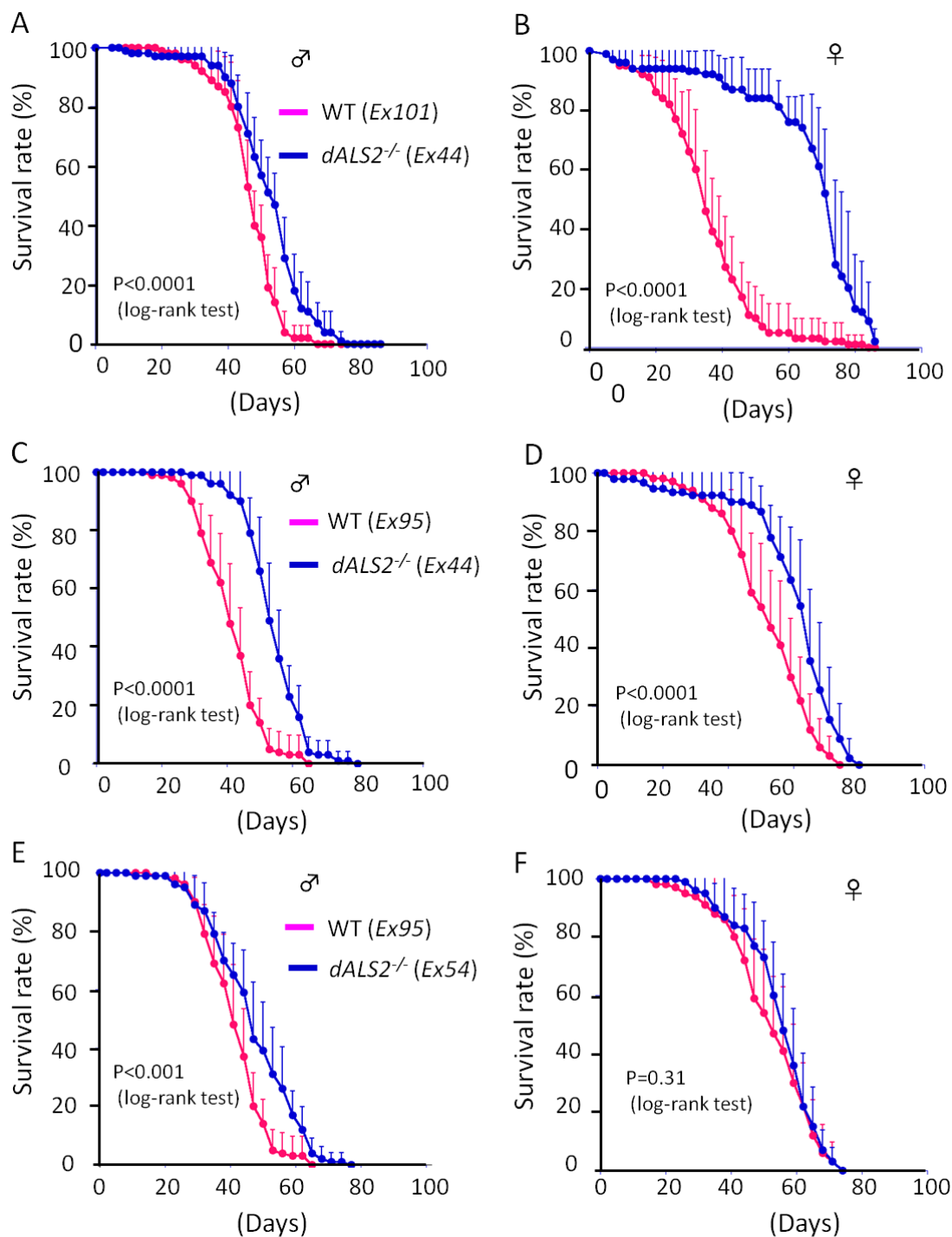


Figure 19 寿命アッセイ

野生型（マゼンタ）と *dALS2*^{-/-}（青）の成虫を通常条件で飼育したときの、生存率の低下を調べた。A、C、そして E はオスの生存率を、B、D、そして F は

メスの生存率を示す。野生型として A と B では *Ex101/Ex101* を、C から F では *Ex95/Ex95* を用いた。*dALS2^{-/-}* として A から D では *Ex44/Ex44* を、E と F では *Ex54/Ex54* を用いた。生存曲線は log-rank test を用いて解析を行い、各パネルに P 値を付した。

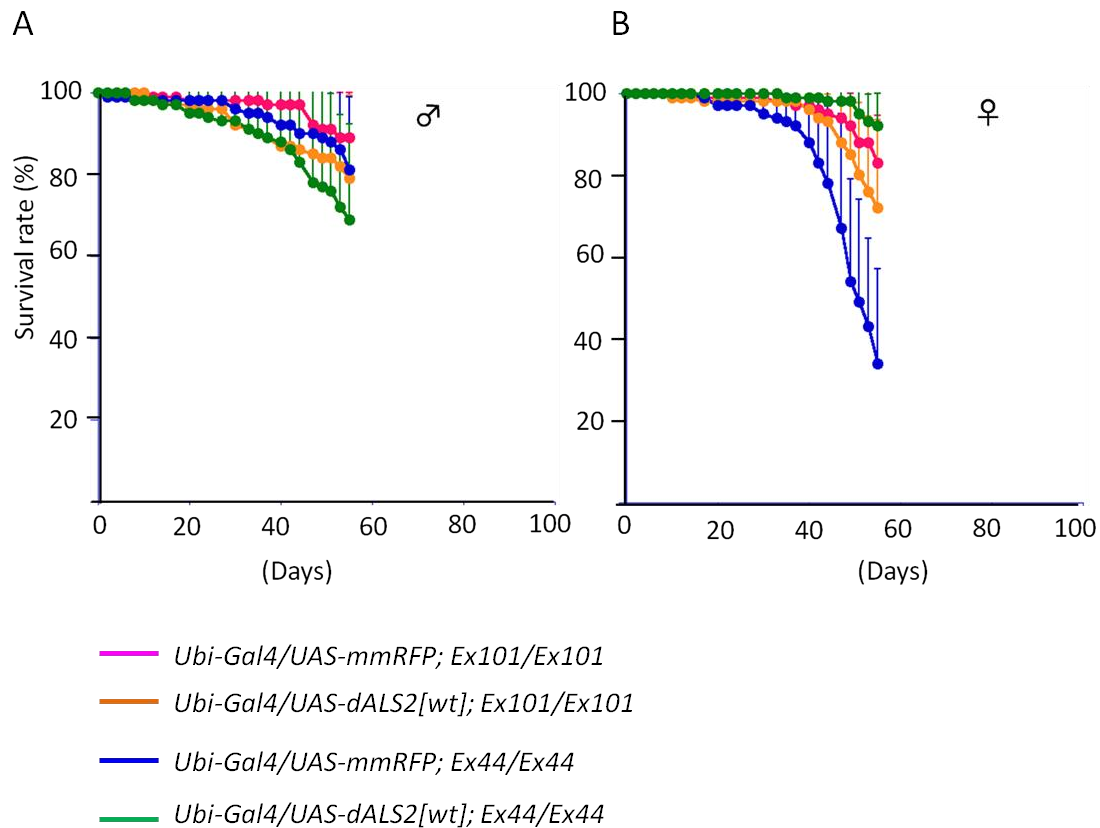


Figure 20 トランスジーンの発現による *dALS2* 突然変異体 (*Ex44/Ex44*) が示す寿命延長表現型のレスキュー実験の試み

Ubi-Gal4 を用いて、*dALS2* 突然変異体 (*Ex44/Ex44*) が示した寿命延長の表現型が回復するかどうか検証を試みた。1日交配させた後、オス (A) とメス (B) とに分け、別々にして飼育した。各遺伝子型を表すために使った色は、Figure 15 と同じである。本実験で用いた遺伝子型では、突然変異体の寿命延長表現型が再現できなかったこともあり、この寿命アッセイは羽化後 50 日の時点で終了した。

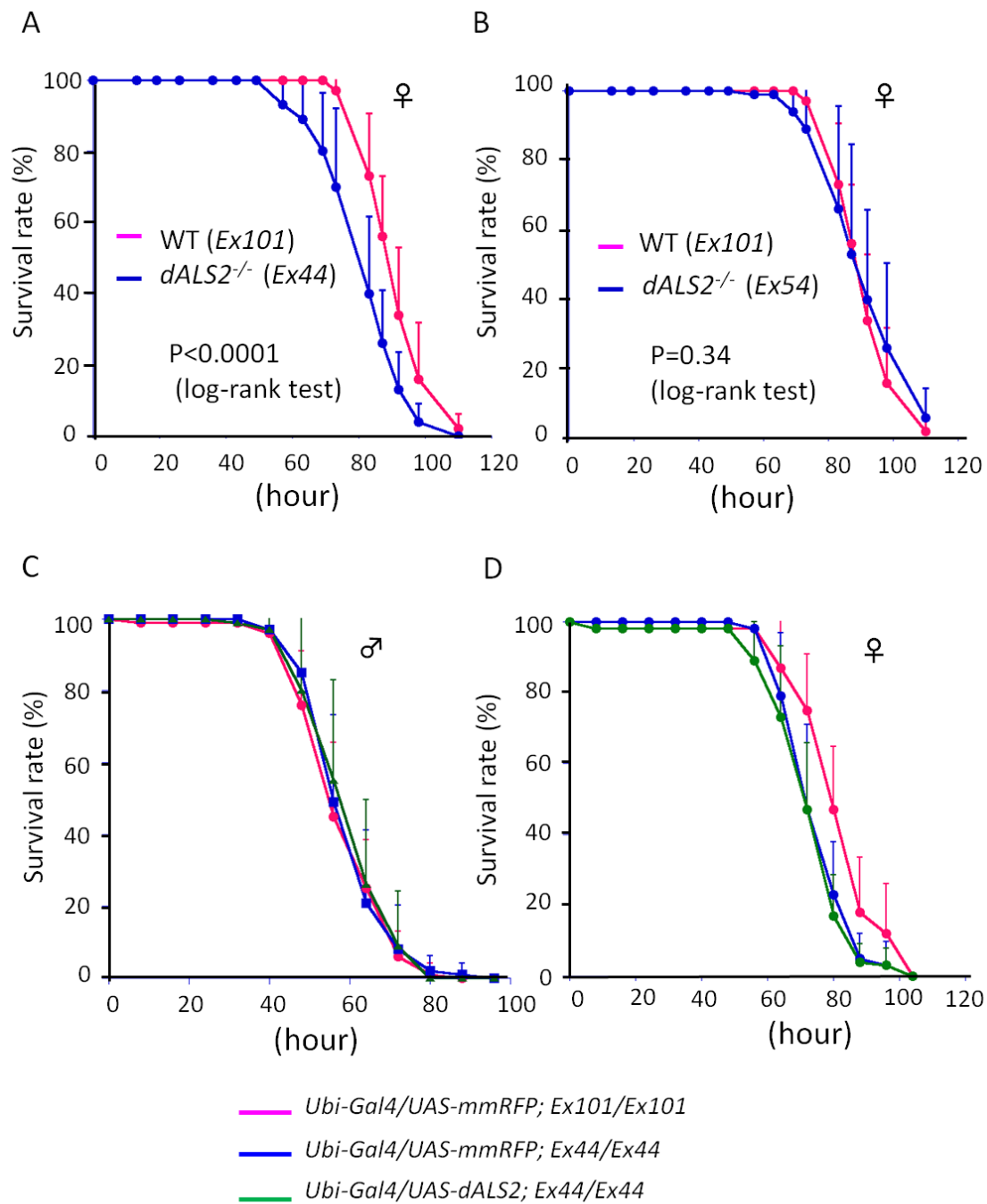


Figure 21 酸化ストレス感受性アッセイ

(A と B) 野生型と *dALS2* 突然変異体を 1% 過酸化水素を含む培地で飼育したときの生存率を示す。野生型として *Ex101/Ex101* (マゼンタ) を用いた。*dALS2* 突然変異体として、*Ex44/Ex44* (A の青線) と *Ex54/Ex54* (B の青線)

を用いた。生存曲線は log-rank test を用いて解析した。A と B は独立して 2 回実験を行っており、そのうちの一回の結果を提示している（詳細は本文参照）。

（C と D） *Ex44/Ex44* が示した酸化ストレス高感受性表現型のレスキュー実験の試み。*Ubi-Gal4* を用いてトランスジーンを発現させ、表現型が回復するかどうか検証した。野生型（マゼンタ）、*Ex44/Ex44* 突然変異体（青）、そして *Ubi-Gal4* で *dALS2* トランスジーンを発現する突然変異体（緑）を比較した。このパネルで各遺伝子型を表すために用いた色は、Figure 15 と同様である。（C）野生型オスと突然変異体オスとの間には、酸化ストレス感受性に有意な違いは見られない。（D）突然変異体のメスは、野生型メスよりも酸化ストレスに対して、より高感受性であった（青とマゼンタを比較; $P=0.012$ ）。しかしながら、*Ubi-Gal4* を用いて *dALS2* トランスジーンを発現させても、突然変異体のメスが呈した酸化ストレス高感受性の表現型は回復しなかった（緑）。

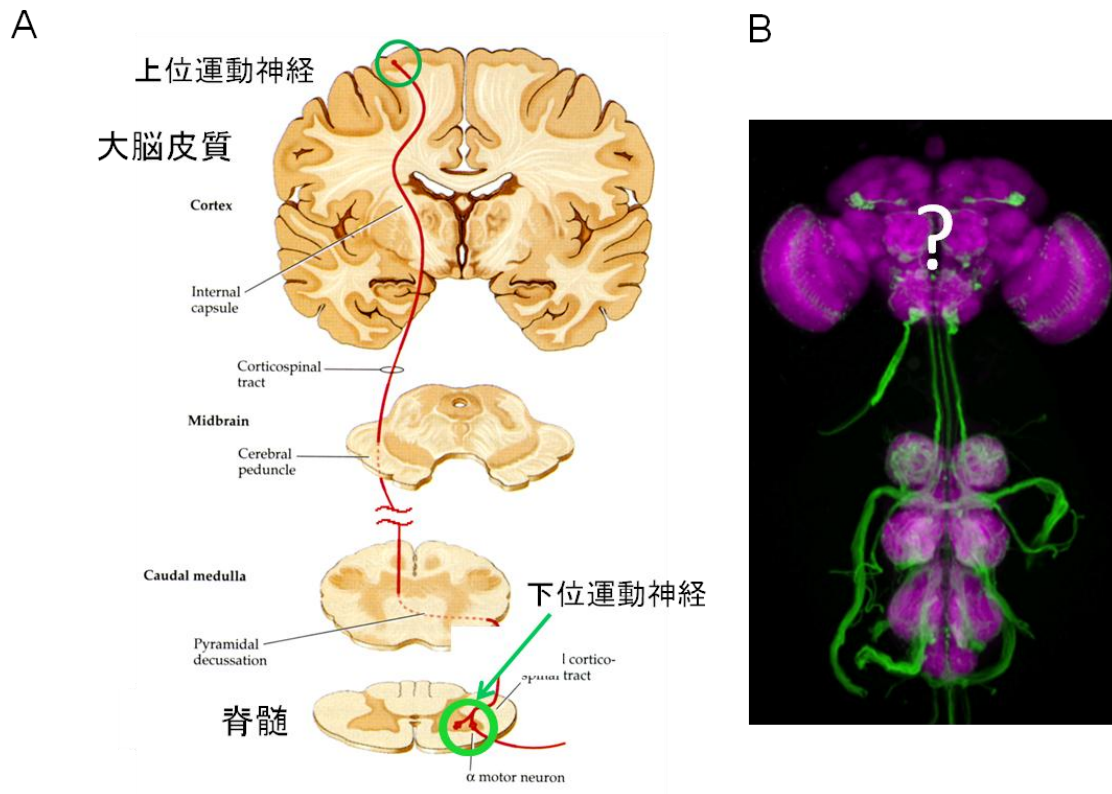


Figure 22 ヒトとショウジョウバエの運動回路の比較

(A) ヒトの運動回路の模式図。緑の丸印は、上位運動神経の細胞体の位置、あるいは下位運動神経の細胞体の位置を示す。上位運動神経の細胞体は大腦皮質の一次運動野にあり、軸索を脊髓へ投射する。下位運動神経の細胞体は脳幹や脊髓にあり、軸索を骨格筋に投射して筋肉の収縮を制御する。Purves (1997) の Figure 16.9 より改変した。

(B) ショウジョウバエ成虫の中樞神経系の染色像。中枢神経系内の限られた数の細胞（緑のシグナル）とプレシナプスの active zone 全体（マゼンタのシグナル）が染色されている。「？」は、ハエに上位運動神経があるかどうかいまだに分かっていないことを表す。本研究で観察したのは下位運動神経である。www.janelia.org/team-project/fly-light より改変した。

文献

Ali, Y.O., Escala, W., Ruan, K., and Zhai, R.G. (2011). Assaying locomotor, learning, and memory deficits in *Drosophila* models of neurodegeneration. *J Vis Exp* 49, 2504.

Bartlett, B.J., Isakson, P., Lewerenz, J., Sanchez, H., Kotzebue, R.W., Cumming, R.C., Harris, G.L., Nezis, I.P., Schubert, D.R., Simonsen, A., *et al.* (2011). p62, Ref(2)P and ubiquitinated proteins are conserved markers of neuronal aging, aggregate formation and progressive autophagic defects. *Autophagy* 7, 572-583.

Ben Hamida, M., Hentati, F., and Ben Hamida, C. (1990). Hereditary motor system diseases (chronic juvenile amyotrophic lateral sclerosis). Conditions combining a bilateral pyramidal syndrome with limb and bulbar amyotrophy. *Brain* 113 (Pt 2), 347-363.

Boillee, S., Yamanaka, K., Lobsiger, C.S., Copeland, N.G., Jenkins, N.A., Kassiotis, G., Kollias, G., and Cleveland, D.W. (2006). Onset and progression in inherited ALS determined by motor neurons and microglia. *Science* 312, 1389-1392.

Brand, A.H., and Perrimon, N. (1993). Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. *Development* 118, 401-415.

Cai, H., Lin, X., Xie, C., Laird, F.M., Lai, C., Wen, H., Chiang, H.C., Shim, H., Farah, M.H., Hoke, A., *et al.* (2005). Loss of ALS2 function is insufficient to trigger motor neuron degeneration in knock-out mice but predisposes neurons to oxidative stress. *J Neurosci* 25, 7567-7574.

Cai, H., Shim, H., Lai, C., Xie, C., Lin, X., Yang, W.J., and Chandran, J. (2008). ALS2/alsin knockout mice and motor neuron diseases. *Neurodegener Dis* 5, 359-366.

Chan, C.C., Scoggin, S., Wang, D., Cherry, S., Dembo, T., Greenberg, B., Jin, E.J., Kuey, C., Lopez, A., Mehta, S.Q., *et al.* (2011). Systematic discovery of Rab GTPases with synaptic functions in *Drosophila*. *Curr Biol* 21, 1704-1715.

Coyle, I.P., Koh, Y.H., Lee, W.C., Slind, J., Fergestad, T., Littleton, J.T., and Ganetzky, B. (2004). Nervous wreck, an SH3 adaptor protein that interacts with Wsp, regulates synaptic growth in *Drosophila*. *Neuron* 41, 521-534.

Deng, H.X., Zhai, H., Fu, R., Shi, Y., Gorrie, G.H., Yang, Y., Liu, E., Dal Canto, M.C., Mugnaini, E., and Siddique, T. (2007). Distal axonopathy in an

alsin-deficient mouse model. *Hum Mol Genet* 16, 2911-2920.

Devon, R.S., Orban, P.C., Gerrow, K., Barbieri, M.A., Schwab, C., Cao, L.P., Helm, J.R., Bissada, N., Cruz-Aguado, R., Davidson, T.L., *et al.* (2006). Als2-deficient mice exhibit disturbances in endosome trafficking associated with motor behavioral abnormalities. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 9595-9600.

Diaper, D.C., Adachi, Y., Sutcliffe, B., Humphrey, D.M., Elliott, C.J., Stepto, A., Ludlow, Z.N., Vanden Broeck, L., Callaerts, P., Dermaut, B., *et al.* (2013). Loss and gain of *Drosophila* TDP-43 impair synaptic efficacy and motor control leading to age-related neurodegeneration by loss-of-function phenotypes. *Hum Mol Genet* 22, 1539-1557.

Entchev, E.V., Schwabedissen, A., and Gonzalez-Gaitan, M. (2000). Gradient formation of the TGF-beta homolog Dpp. *Cell* 103, 981-991.

Feiguin, F., Godena, V.K., Romano, G., D'Ambrogio, A., Klima, R., and Baralle, F.E. (2009). Depletion of TDP-43 affects *Drosophila* motoneurons terminal synapsis and locomotive behavior. *FEBS Lett* 583, 1586-1592.

Finn, R.D., Bateman, A., Clements, J., Coghill, P., Eberhardt, R.Y., Eddy, S.R., Heger, A., Hetherington, K., Holm, L., Mistry, J., *et al.* (2014). Pfam: the protein families database. *Nucleic Acids Res* 42, D222-230.

Ganetzky, B., and Flanagan, J.R. (1978). On the relationship between senescence and age-related changes in two wild-type strains of *Drosophila melanogaster*. *Exp Gerontol* 13, 189-196.

Geer, L.Y., Marchler-Bauer, A., Geer, R.C., Han, L., He, J., He, S., Liu, C., Shi, W., and Bryant, S.H. (2010). The NCBI BioSystems database. *Nucleic Acids Res* 38, D492-496.

Hadano, S., Benn, S.C., Kakuta, S., Otomo, A., Sudo, K., Kunita, R., Suzuki-Utsunomiya, K., Mizumura, H., Shefner, J.M., Cox, G.A., *et al.* (2006). Mice deficient in the Rab5 guanine nucleotide exchange factor ALS2/alsin exhibit age-dependent neurological deficits and altered endosome trafficking. *Hum Mol Genet* 15, 233-250.

Hadano, S., Kunita, R., Otomo, A., Suzuki-Utsunomiya, K., and Ikeda, J.E. (2007). Molecular and cellular function of ALS2/alsin: implication of membrane dynamics in neuronal development and degeneration. *Neurochem Int* 51, 74-84.

Hadano, S., Otomo, A., Kunita, R., Suzuki-Utsunomiya, K., Akatsuka, A., Koike, M., Aoki, M., Uchiyama, Y., Itoyama, Y., and Ikeda, J.E. (2010). Loss of ALS2/Alsin exacerbates motor dysfunction in a SOD1-expressing mouse ALS model by disturbing endolysosomal trafficking. *PLoS One* 5, e9805.

Hattori, Y., Sugimura, K., and Uemura, T. (2007). Selective expression of Knot/Collier, a transcriptional regulator of the EBF/Olf-1 family, endows the *Drosophila* sensory system with neuronal class-specific elaborated dendritic patterns. *Genes Cells* 12, 1011-1022.

Hebbar, S., Hall, R.E., Demski, S.A., Subramanian, A., and Fernandes, J.J. (2006). The adult abdominal neuromuscular junction of *Drosophila*: a model for synaptic plasticity. *J Neurobiol* 66, 1140-1155.

Imlach, W.L., Beck, E.S., Choi, B.J., Lotti, F., Pellizzoni, L., and McCabe, B.D. (2012). SMN is required for sensory-motor circuit function in *Drosophila*. *Cell* 151, 427-439.

Jaiswal, M., Sandoval, H., Zhang, K., Bayat, V., and Bellen, H.J. (2012). Probing mechanisms that underlie human neurodegenerative diseases in *Drosophila*. *Annu Rev Genet* 46, 371-396.

Jan, Y.N., and Jan, L.Y. (2010). Branching out: mechanisms of dendritic arborization. *Nat Rev Neurosci* 11, 316-328.

Jekely, G., Sung, H.H., Luque, C.M., and Rorth, P. (2005). Regulators of endocytosis maintain localized receptor tyrosine kinase signaling in guided migration. *Dev Cell* 9, 197-207.

Jenett, A., Robberecht, G.M., Ngo, T.T., Shepherd, D., Murphy, C., Dionne, H., Pfeiffer, B.D., Cavallaro, A., Hall, D., Jeter, J., *et al.* (2012). A GAL4-driver line resource for *Drosophila* neurobiology. *Cell Rep* 2, 991-1001.

Kakihara, K., Shinmyozu, K., Kato, K., Wada, H., and Hayashi, S. (2008). Conversion of plasma membrane topology during epithelial tube connection requires Arf-like 3 small GTPase in *Drosophila*. *Mechanisms of development* 125, 325-336.

Kato, S. (2008). Amyotrophic lateral sclerosis models and human neuropathology: similarities and differences. *Acta Neuropathol* 115, 97-114.

Kitano, M., Nakaya, M., Nakamura, T., Nagata, S., and Matsuda, M. (2008). Imaging of Rab5 activity identifies essential regulators for phagosome maturation. *Nature* 453, 241-245.

Kohsaka, H., Okusawa, S., Itakura, Y., Fushiki, A., and Nose, A. (2012). Development of larval motor circuits in *Drosophila*. *Dev Growth Differ* 54, 408-419.

Kunita, R., Otomo, A., Mizumura, H., Suzuki, K., Showguchi-Miyata, J., Yanagisawa, Y., Hadano, S., and Ikeda, J.E. (2004). Homo-oligomerization of ALS2 through its unique carboxyl-terminal regions is essential for the

ALS2-associated Rab5 guanine nucleotide exchange activity and its regulatory function on endosome trafficking. *J Biol Chem* 279, 38626-38635.

Kunita, R., Otomo, A., Mizumura, H., Suzuki-Utsunomiya, K., Hadano, S., and Ikeda, J.E. (2007). The Rab5 activator ALS2/alsin acts as a novel Rac1 effector through Rac1-activated endocytosis. *J Biol Chem* 282, 16599-16611.

Lai, C., Xie, C., Shim, H., Chandran, J., Howell, B.W., and Cai, H. (2009). Regulation of endosomal motility and degradation by amyotrophic lateral sclerosis 2/alsin. *Mol Brain* 2, 23.

Le Bourg, E., and Lints, F.A. (1992). Hypergravity and aging in *Drosophila melanogaster*. 4. Climbing activity. *Gerontology* 38, 59-64.

Lessing, D., and Bonini, N.M. (2009). Maintaining the brain: insight into human neurodegeneration from *Drosophila melanogaster* mutants. *Nat Rev Genet* 10, 359-370.

Linford, N.J., Bilgir, C., Ro, J., and Pletcher, S.D. (2013). Measurement of lifespan in *Drosophila melanogaster*. *J Vis Exp*.

Mahr, A., and Aberle, H. (2006). The expression pattern of the *Drosophila* vesicular glutamate transporter: a marker protein for motoneurons and glutamatergic centers in the brain. *Gene Expr Patterns* 6, 299-309.

Matsubara, D., Horiuchi, S.Y., Shimono, K., Usui, T., and Uemura, T. (2011). The seven-pass transmembrane cadherin Flamingo controls dendritic self-avoidance via its binding to a LIM domain protein, Espinas, in *Drosophila* sensory neurons. *Genes Dev* 25, 1982-1996.

Menon, K.P., Carrillo, R.A., and Zinn, K. (2013). Development and plasticity of the *Drosophila* larval neuromuscular junction. *Wiley Interdiscip Rev Dev Biol* 2, 647-670.

Mori, Y., Matsui, T., and Fukuda, M. (2013). Rabex-5 protein regulates dendritic localization of small GTPase Rab17 and neurite morphogenesis in hippocampal neurons. *J Biol Chem* 288, 9835-9847.

Otomo, A., Hadano, S., Okada, T., Mizumura, H., Kunita, R., Nishijima, H., Showguchi-Miyata, J., Yanagisawa, Y., Kohiki, E., Suga, E., *et al.* (2003). ALS2, a novel guanine nucleotide exchange factor for the small GTPase Rab5, is implicated in endosomal dynamics. *Hum Mol Genet* 12, 1671-1687.

Otomo, A., Kunita, R., Suzuki-Utsunomiya, K., Ikeda, J.E., and Hadano, S. (2011). Defective relocalization of ALS2/alsin missense mutants to Rac1-induced macropinosomes accounts for loss of their cellular function and leads to disturbed amphisome formation. *FEBS Lett* 585, 730-736.

Otomo, A., Kunita, R., Suzuki-Utsunomiya, K., Mizumura, H., Onoe, K., Osuga, H., Hadano, S., and Ikeda, J.E. (2008). ALS2/alsin deficiency in neurons leads to mild defects in macropinocytosis and axonal growth. *Biochem Biophys Res Commun* 370, 87-92.

Parrish, J.Z., Xu, P., Kim, C.C., Jan, L.Y., and Jan, Y.N. (2009). The microRNA bantam functions in epithelial cells to regulate scaling growth of dendrite arbors in drosophila sensory neurons. *Neuron* 63, 788-802.

Pasinelli, P., and Brown, R.H. (2006). Molecular biology of amyotrophic lateral sclerosis: insights from genetics. *Nat Rev Neurosci* 7, 710-723.

Purves, D., Augustine, G.J., Fitzpatrick, D., Katz, L.C., LaMantia, A.-S., McNamara, J.O. (Eds). (1997). *Neuroscience*. Sunderland, MA.

Pircs, K., Nagy, P., Varga, A., Venkei, Z., Erdi, B., Hegedus, K., and Juhasz, G. (2012). Advantages and limitations of different p62-based assays for estimating autophagic activity in *Drosophila*. *PLoS One* 7, e44214.

Robberecht, W., and Philips, T. (2013). The changing scene of amyotrophic lateral sclerosis. *Nat Rev Neurosci* 14, 248-264.

Rothstein, J.D. (2009). Current hypotheses for the underlying biology of amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol* 65 Suppl 1, S3-9.

Sann, S.B., Crane, M.M., Lu, H., and Jin, Y. (2012). Rabx-5 regulates RAB-5 early endosomal compartments and synaptic vesicles in *C. elegans*. *PLoS One* 7, e37930.

Satoh, D., Sato, D., Tsuyama, T., Saito, M., Ohkura, H., Rolls, M.M., Ishikawa, F., and Uemura, T. (2008). Spatial control of branching within dendritic arbors by dynein-dependent transport of Rab5-endosomes. *Nat Cell Biol* 10, 1164-1171.

Shimono, K., Fujimoto, A., Tsuyama, T., Yamamoto-Kochi, M., Sato, M., Hattori, Y., Sugimura, K., Usui, T., Kimura, K., and Uemura, T. (2009). Multidendritic sensory neurons in the adult *Drosophila* abdomen: origins, dendritic morphology, and segment- and age-dependent programmed cell death. *Neural Dev* 4, 37.

Simonsen, A., Cumming, R.C., Brech, A., Isakson, P., Schubert, D.R., and Finley, K.D. (2008). Promoting basal levels of autophagy in the nervous system enhances longevity and oxidant resistance in adult *Drosophila*. *Autophagy* 4, 176-184.

St Pierre, S.E., Ponting, L., Stefancsik, R., and McQuilton, P. FlyBase 102--advanced approaches to interrogating FlyBase. (2014). *Nucleic Acids Res* 42, D780-788.

Stenmark, H. (2009). Rab GTPases as coordinators of vesicle traffic. *Nat Rev Mol Cell Biol* 10, 513-525.

Strauss, R. (2002). The central complex and the genetic dissection of locomotor behaviour. *Curr Opin Neurobiol* 12, 633-638.

Tonoki, A., Kuranaga, E., Tomioka, T., Hamazaki, J., Murata, S., Tanaka, K., and Miura, M. (2009). Genetic evidence linking age-dependent attenuation of the 26S proteasome with the aging process. *Mol Cell Biol* 29, 1095-1106.

Tsuyama, T., Kishikawa, J., Han, Y.W., Harada, Y., Tsubouchi, A., Noji, H., Kakizuka, A., Yokoyama, K., Uemura, T., and Imamura, H. (2013). In vivo fluorescent adenosine 5'-triphosphate (ATP) imaging of *Drosophila melanogaster* and *Caenorhabditis elegans* by using a genetically encoded fluorescent ATP biosensor optimized for low temperatures. *Anal Chem* 85, 7889-7896.

Vrailas-Mortimer, A., del Rivero, T., Mukherjee, S., Nag, S., Gaitanidis, A., Kadas, D., Consoulas, C., Duttaroy, A., and Sanyal, S. (2011). A muscle-specific p38 MAPK/Mef2/MnSOD pathway regulates stress, motor function, and life span in *Drosophila*. *Dev Cell* 21, 783-795.

Weiss, L.A., Dahanukar, A., Kwon, J.Y., Banerjee, D., and Carlson, J.R. (2011). The molecular and cellular basis of bitter taste in *Drosophila*. *Neuron* 69, 258-272.

Wucherpfennig, T., Wilsch-Brauninger, M., and Gonzalez-Gaitan, M. (2003). Role of *Drosophila* Rab5 during endosomal trafficking at the synapse and evoked neurotransmitter release. *J Cell Biol* 161, 609-624.

Yamanaka, K., Miller, T.M., McAlonis-Downes, M., Chun, S.J., and Cleveland, D.W. (2006). Progressive spinal axonal degeneration and slowness in ALS2-deficient mice. *Ann Neurol* 60, 95-104.

Yamanaka, K., Vande Velde, C., Eymard-Pierre, E., Bertini, E., Boespflug-Tanguy, O., and Cleveland, D.W. (2003). Unstable mutants in the peripheral endosomal membrane component ALS2 cause early-onset motor neuron disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 16041-16046.

Yan, H., Jahanshahi, M., Horvath, E.A., Liu, H.Y., and Pfeleger, C.M. (2010). Rabex-5 ubiquitin ligase activity restricts Ras signaling to establish pathway homeostasis in *Drosophila*. *Curr Biol* 20, 1378-1382.

Zito, K., Parnas, D., Fetter, R.D., Isacoff, E.Y., and Goodman, C.S. (1999). Watching a synapse grow: noninvasive confocal imaging of synaptic growth in *Drosophila*. *Neuron* 22, 719-729.

Supplementary information

Supplemental movie 1

コントロールの成虫の運動能力（羽化後 0-3 日目）。遺伝子型は *OK371-Gal4/UAS-mmRFP* である。

Supplemental movie 2

*Rab5[S34N]*を運動神経で発現させた成虫の運動能力（羽化後 0-3 日目）。成虫を底面に落とした後、10 秒以上記録した。遺伝子型は *OK371-Gal4/+; UAS-Rab5[S34N]/+* である。